

特表平7-503622

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)4月20日

(51)Int.Cl.\*

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 P 21/08

9161-4B

C 0 7 K 16/00

8318-4H

16/18

8318-4H

16/32

8318-4H

9050-4B

C 1 2 N 15/ 00

Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 17 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-514437

(86) (22)出願日 平成5年(1993)12月10日

(85)翻訳文提出日 平成6年(1994)8月11日

(86)国際出願番号 PCT/US93/12039

(87)国際公開番号 WO94/13806

(87)国際公開日 平成6年(1994)6月23日

(31)優先権主張番号 990, 263

(32)優先日 1992年12月11日

(33)優先権主張国 米国 (US)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(71)出願人 ザ ダウ ケミカル カンパニー

アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, アボット ロード, ダウ センター 2030

(72)発明者 メゼス, ビーター エス.

アメリカ合衆国, コネチカット 06371, オールドライム, シル レーン 25

(72)発明者 ゴーリー, ブライアン ビー.

アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, オーチャード ドライブ 3713

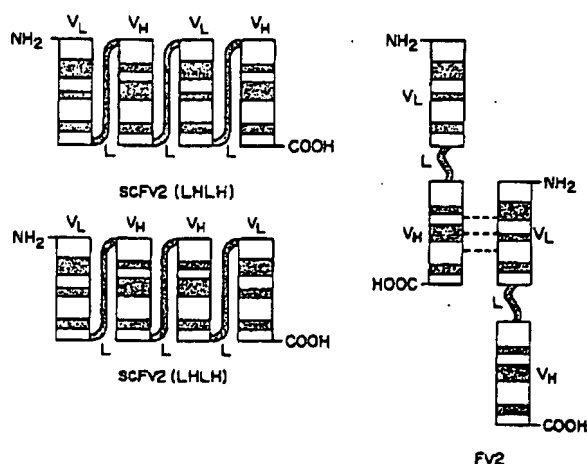
(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

(54)【発明の名称】 多価の一本鎖抗体

## (57)【要約】

本発明は、2以上の生物学的に活性な抗原結合部位を有する多価の一本鎖抗体を開示する。この多価の一本鎖抗体は、2本以上の一本鎖抗体を共有結合させるペプチドリンカーを用いることによって作った。各一本鎖抗体は、ペプチドリンカーにより、可変重鎖ドメインに連結されている可変軽鎖ドメインを有する。

共有及び非共有結合型一本鎖Fv多量体の図解



## 浄書(内容に変更なし)

## 請求の範囲

1. 2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと

連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、多価の一本鎖抗体。

2. この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys  
Asp Leu

を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

3. この軽鎖可変領域が、図3に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そしてこの重鎖可変領域が、図5に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

4. この第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

5. 多価の一本鎖抗体をコードするDNA配列であって、この多価の一本鎖抗体が2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;

## 浄書(内容に変更なし)

## 明細書

## 多価の一本鎖抗体

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質にตอบสนองして免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四量体、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>と称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクター機能をもちあす。

アミノ酸配列データは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FR)によりフラックされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると推定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは10の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は診

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び  
(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、DNA配列。

6. この第一のポリペプチドをコードする配列が図2のそれと実質的に同じであり、そして第二のポリペプチドをコードする配列が図3のそれと実質的に同じである、請求項5記載のDNA配列。

断及び治療剤の両方として有用とされている。モノクローナル抗体は、確立された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエローマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより日常的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断にとってのネズミ抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗マウス抗体応答に基づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可変領域が別の種に由来する抗体の定常領域と組合されたものが組換えDNA方法論により作られている。例えば、Sahagenら、J. Immunol., 137: 1066-1074 (1986); Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1987); Nishimuraら、Cancer Res., 47: 999-1005 (1987); 及び Lieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439-3443 (1987)を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開示している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その薬理動力学に影響を及ぼすタンパク質構造全体のうちの主要部分を構成するFc領域を保有し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、標的組織に迅速に集中し、且つ結合する抗体分子を得ること、及び未結合の物質が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さな抗体フラグメントは高めの毛管浸透性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV<sub>L</sub>と一本のV<sub>H</sub>とにより一本鎖抗体フラグメント(scFvs)が作られており、これは8つのCDRを含み、それらはペプチドリンカ

ー(米国特許第 4,946,778号)により連結された $V_L-L-V_H$ ポリペプチドを成しており、ここで $L$ はペプチドリンカーを表している。 $V_L$ と $V_H$ ドメインが配向 $V_H-L-V_L$ であるscFvが米国特許第 5,132,405号に開示されている。

完全抗体にとっての最少限の2つの結合部位と比べてscFvは一つのそれを有するため、scFvは2以上の結合部位を含む抗体に比べて低い活性を有している。

従って、このポリペプチドの活性を高めるため、且つその抗原認識特性を維持又は高めるため、複数の結合部位を有するscFvの構築体を得ることが有利であろう。加えて、個々の組織上の別々のエピトープの認識を可能とする、別の免疫エフェクター機能の抗体ベースを増強を可能とする、又は治療もしくは診断成分の抗体捕獲を可能とする二価特異的である多価scFvを獲得することが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本の $V_L$ と一本の $V_H$ ドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第二ペプチドリンカーによって共有結合されて、完全抗体の結合親和力を維持している多価一本鎖抗体を形成できうことが発見された。一態様において、本発明は抗原に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は2本以上の軽鎖可変ドメインと2本以上の重鎖可変ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の態様において、本発明は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。

別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードする DNA 配列を提供し、ここでこの多価の一本鎖抗体は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。

この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が2種類の抗原決定基でありうる多価一本鎖抗体の構築も可能とするであろう。

#### 図面の簡単な説明

図1は、 $V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$  (LHLH)と $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$  (LHHL)の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型Fv一本鎖抗体(Fv2)を示す。

図2は CC49V<sub>L</sub> のヌクレオチド配列を示す。

図3は CC49V<sub>L</sub> のアミノ酸配列を示す。

図4は CC49V<sub>H</sub> のヌクレオチド配列を示す。

図5は CC49V<sub>H</sub> のアミノ酸配列を示す。

図6は p49LHLHにおけるCC49一本鎖抗体LHLHのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図7は p49LHHLにおけるCC49一本鎖抗体LHHLのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図8はプラスミド pSL301T及びpSL301HTの構築を示す。

図9はプラスミド p49LHHLの構築を示す。

図10はプラスミド p49LHLHの構築を示す。

図11はCC49IgG、CC49scFv2及びCC49scFvを用いた、競合因子としてビオチニル化 CC49IgGを用いる競合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明細書に組入れる。

核酸、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基等を略すとき、それらはIUPAC IUB (Commission on Biological Nomenclature) 又は関連分野の実際に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv)又は「抗体フラグメント」なる語は、 $V_L-L-V_H$ により表わされる、ペプチドリンカー(L)により $V_H$ ドメインに連結された $V_L$ ドメインを含むポリペプチドを意味する。 $V_L$ と $V_H$ ドメインとの順序は逆であってよく、 $V_H-L-V_L$ として表わされるポリペプチドが獲得できうる。「ドメイン」は、独立の機能、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した2以上の一本鎖抗体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

$V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$ ； $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$ ； $V_H-L-V_L-L-V_H-L-V_L$ ；又は

$V_H-L-V_L-L-V_L-L-V_H$

の $V_L$ と $V_H$ ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチド間リンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された1又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、 $V_L$ と $V_H$ ドメインの数は等しい。

本発明は、

$V_H-L-V_H-L-V_L-L-V_L$ 又は $V_L-L-V_L-L-V_H-L-V_H$

で表される多価の一本鎖抗体も提供する。

$V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$  (LHLH) 及び $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$  (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図1に示す。非共有結合型Fv一本鎖抗体(Fv2)も図1に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の軽鎖及び／又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その軽鎖と重鎖可変ドメインは同一の抗原に特異的である。連結されて多価の一本鎖抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についての DNA 配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の起源が必要とされる。適当な DNA 配列は公共の起源から入手するか、又は当業界に公知の標準の手法によって獲得できうる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Services により公開された KabatらのSequences of Proteins of Immunological Interest 第4版(1991)は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を開示している。遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローンする DNA の起

源として、逆転写酵素仲介合成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの起源は広範囲にわたるハイブリドーマから獲得できうる。例えば、カタログATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Culture Collection, 20309 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1990) を参照のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用できる。これらの細胞系及びその他の類似の種類が、可変ドメインをコードするmRNAの起源として、又はモノクローナル抗体自体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を獲得するように利用できうる。

抗体の可変領域は、適当な脊椎動物、通常は家畜動物とそして最も好都合にはマウスを免疫することにより得られもする。その免疫原は課題の抗原であるか、又はハプテンであるとき、キーホールリンベットヘモシアニン(KLH)の如きの抗原に対するこのハプテンの抗原性複合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2〜3週間置きの免疫原の1又は数回の繰り返し注射によって好適に実施されうる。通常、最後の負荷の3日後、脾臓を取り出し、そしてmRNAが当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できうるようにハイブリドーマを供するための細胞融合に利用する単細胞へと解離する。

課題の抗体が獲得でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>ドメインは好ましくは、1990年3月3日に公開されたPCT出願WO 90/04410及び1989年1月26日に公開されたPCT出願WO 89/00692に開示されている、腫瘍関連糖タンパク質72抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、PCT公開WO 90/04410及びWO 89/00692に

する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その個々の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように付加されていることも必要である。

好適なリンカーは、PantollanoらのBiochem., 30, 10117-10125 (1981)に開示されている205Cと称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にあるXhoI部位と、他端にあるHindIII部位により指定されるコドンで理由に変わらされている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5)は下記の通りである：

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu。

このリンカーは一般に10〜50のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは10〜30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンカーは12〜30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは15〜25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性な種に由来するレプリコンとコントロール配列とを含む。このベクターは通常レプリコン部位、及び形質転換細胞の中での表現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保有している。例えば、大腸菌(*E. coli*)はpBR322を用いて容易に形質転換される〔Bolivarら、Gene, 2, 95-(1977)又はSambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 第2版(1989)〕。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できうる。S. セレビジェ(*S. cerevisiae*)又は一般のパン酵母が真核微生物の中で最も

においてCC49と表示されているモノクローナル抗体に由来するV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>ドメインである。CC49のV<sub>L</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1)は図1に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>L</sub>のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2)は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>H</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>H</sub>をコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)は図4に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリinkerを得ることが必要である。V<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>ドメインを連結するための適当なリンカーは、V<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>ドメインが、一本鎖ポリペプチドであって完全抗体のものと構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを連結するための適当なリンカーは、各イムノグロブリンフラグメントのV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインが三次元構造であって、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次元構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なものである。所望の特性を有するリンカーは、その開示内容を引用することで本明細書に組入れる米国特許第4,946,778号に開示の方法により獲得できうる。この第4,946,778号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が獲得できうる。

好ましくは、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリinkerと、2以上のscFvを連結して多価の一本鎖抗体を形成せしめるペプチドリinkerとは実質的に同じアミノ酸配列を有

一般的に利用されているが、数多くのその他の株、例えばピシアバストリス(*Pichia pastoris*)が有用である。多細胞生物、例えばATCCより入手できるSP2/O又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できうる。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミドはpSV2neo及びpSV2gpt(ATCC); pSVL及びpKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1/pML2d (International Biotechnology, Inc.)である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための原核及び真核ウィルス発現ベクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入連結部において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域にとって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより処理し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、前掲に記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構築体は、構成的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ポリペプチドの合成/細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その発現速度は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために輸送、折りたたみ及び集成過程とつり合う。レプリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの最適な合成にとって追加の要素が必要とされうる。これらの要素にはスプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその生成物が集成及び折りたたみを助長するために必要とされうる(シャペロン)。

市販されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たす

ように簡単に改変されうる。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選別できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、組換え DNA 技術を用いて構築されたベクターにより組換的に形質転換されうる細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、夾雑微生物が培養培地の中で繁殖することを防ぐうえで利用されうる。この態様において、かかる純粋な形質転換細胞の培養物は生存のために誘発された表現型を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業界に公知の標準技術を利用して達成されうる。例えば、もしそれらが培養培地の中に分泌されるなら、この一本鎖の多価抗体は限外濾過により濃縮されうる。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、精製はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで限外濾過、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を実行することにより達成されうる。不溶性であり、且つ屈折体 (refractile bodies)、通称封入体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、封入体を単離するための遠心と洗浄の繰り返し、例えば guanidinium-HCl による可溶化、及び再度の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって精製できる。

一本鎖の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば競合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 及びラジオイムノアッセイ (RIA) により測定できる。

IEP	等電点電気泳動
Kbp	キロ塩基対
LB	Luria-Bertani 培地
Mab	モノクローナル抗体
MES	2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸
MW	分子量
NBT	ニトロブルーテトラゾリウムクロリド
オリゴ	オリゴヌクレオチド
PAG	ポリアクリルアミドゲル
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	リン酸緩衝食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
pSCFV	SCFV をコードする DNA 配列を含むプラスミド
RIGS	ラジオイムノガイド外科
RIT	ラジオイムノ治療
scFv	一本鎖 Fv イムノグロブリンフラグメントモノマー
scFvs	共有結合した一本鎖 Fv イムノグロブリンフラグメントダイマー
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
TBS	トリス緩衝食塩水
トリス	(トリス〔ヒドロキシメチル〕アミノメタン)
TTBS	ツイーン 20 洗浄液
V <sub>H</sub>	イムノグロブリン重鎖可変ドメイン
V <sub>L</sub>	イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン

#### 抗体

CC49: ヒト腫瘍関連糖タンパク質 72 (TAG-72) に特異的なネズミモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459 として寄託。

本発明の多価の一本鎖抗体は診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多価の一本鎖抗体の利用は、大きめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその標的組織により迅速に到達し、そして身体からより迅速に排除される。

診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は 1 又は複数の抗体フラグメントが標的組織に対して特異的であるように、及び/又は複数の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように構築されうる。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な特に好都合な薬理組成物も考慮しており、ここでこの標的抗原はしばしば細胞の表面上で発現される。診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療剤に当業界に公知の方法によって結合されうる。本発明の薬理組成物は当業界に公知の方法、例えば常用の混合、溶解又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を意図する下記の実施例の考慮により更に明らかにする。

#### 略語

BCIP	5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート
bp	塩基対
Bis-Tris	プロパン (1, 3-ビス〔トリス (ヒドロキシメチル) -メチルアミノ〕プロパン)
BSA	牛血清アルブミン
CDR	相補性決定領域
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
Fv2	非共有一本鎖 Fv ダイマー

CC49PAB: 重鎖の N-末端領域に連結している完全軽鎖より成る CC49 の抗原結合性領域。

CC49scFv: ペプチドリンカーにより連結されている CC49 抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49Fv2: ダイマーを構成するように非共有結合している 2 つの CC49scFv。Fv の後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば CC49Fv6 は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2: 3 つのリンカーにより連結されている、2 本の CC49V<sub>L</sub> ドメインと 2 本の V<sub>H</sub> ドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V<sub>L</sub> (L) と V<sub>H</sub> (H) ドメインとを連結し合わせるのに 6 つの可能な順序の組合せがある: LHLH, LHHL, LLHH, HLLH, HLHL 及び HHLL。

#### プラスミド

pSCFV UHM: 25 のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49 の可変軽鎖と CC49 可変重鎖とより成る scFv についてのコード配列を含むプラスミド。

p49LHLH 又は p49LHHL: CC49scFv2 LHLH 又は LHHL 生成物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

#### 実施例

##### 一般実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することによって本明細書に組入れる。Sambrook ら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 第 2 版 (1989) 及び Ausubel ら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992) に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

オリゴヌクレオチドの合成及び精製

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、標準の $\beta$ -シアノエチルホスホラミジット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 380A又はModel 391 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、濃水酸化アンモニウムの中で55℃で8~15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその粗混合物を30~40 $\mu$ lの滅菌水の中に再懸濁させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲル上での電気泳動の後、オリゴを短波紫外(UV)光を用いて可視化させた。DNAバンドをゲルから切り出し、そして1mlの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのEDTAの中で65℃で2時間かけて溶離させた。最終精製は、DNAをSep-Pac(商標) C-18カラム(Millipore, Bedford, MA)に適用し、そして結合したオリゴを60%のメタノールで溶離させることによって行った。その溶離の体積を約50mlに下げ、そしてDNA濃度を260nm (OD<sub>260</sub>)での光学密度を測定することにより決定した。

制限酵素消化

制限酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 又はBoehringer Mannheim (BW, Indianapolis, IN)の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。消化させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをエチジウムブロミドで染色し、そのDNAバンドを短波UV光により識別化させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ(Union Carbide Corp., Chicago)の中に入れ、そしてMax Submarine電気泳動装置(Hoefer Scientific Instruments,

より測定した。scPv2の結合は、発色の同時低下を伴うビオチニル化CC49の結合の低下をもたらした。

SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SDS-PAGE分析のためのサンプル(20 $\mu$ l)を、非還元用サンプル調製バッファSepasol 1(Integrated Separation Systems(ISS), Natick, MA)の中で5分間煮沸することにより調製し、そして10~20%勾配のポリアクリルアミド Daiichi Minigelにその製造者の仕様書(ISS)に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置(ISS)を用い、ゲル当たり55mAで、一定の電流で約75分を行った。ゲルをクマジーブリアントブルーR-250 (Bio-Rad, Richmond, CA)の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子重量標準品は予め染められており(Mid Range Kit, Diversified Biotech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた: ホスホリラーゼb、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オバルブミン、ラクトートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、 $\beta$ -ラクトグロブリン及びチトクロームC。対応の分子量はそれぞれ95,000、55,000、43,000、36,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュプリケートのゲルも泳動した。電気泳動後、ゲルの一方を陽極バッファ#1(0.3Mのトリス-HCl, pH10.4)の中で15~20分平衡にした。Immobilon-P PVDF(ポリビニリデンジクロリン)膜(Millipore, Bedford, MA)をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に陽極バッファ#1の中で3分平衡にした。Milliblot-SDE装置(Millipore)を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一度の陽極バッファ#1を陽極電極面の中央に載せた。Whatman 3MM 濾紙のシートを陽極バッファ#1の中に浸し、そしてその電

CA)を用いて溶離させた。サンプル容量をSpeed Vac濃縮器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。DNAをエタノール沈殿させ、そして滅菌水の中で再溶解させた。

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら, Can. Res., 46, 850-857 (1986)に実質的に記載の通りに調製したTAG-72抗原を、ポリビニルクロリド96穴マイクロタイタープレート(Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA)のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのプレートをPBS中の1%のBSAで31℃で1時間ブロックし、次いで200 $\mu$ lのPBS, 0.05%のツイーン50で3回洗った。25 $\mu$ lの試験抗体及び25 $\mu$ lのビオチニル化CC49(1/20,000希釈率の1mg/mlの溶液)をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。プレートに結合したTAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間は、余計な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscPvによる競合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5 $\mu$ g/mlのCC49及び10 $\mu$ g/mlのCC49Pabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び/又は濃LBとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの抱合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50 $\mu$ l(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)を加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50 $\mu$ lのパラニトロフェニルホスフェート溶液(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を加え、そして発色反応を最低20分行わせた。scPv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー(Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA)を用い404~450nmでの光学密度スキャンに

極面の上に滑らかに置いた。陽極バッファ#2(25mMのトリス, pH10.4)の中に浸した別の濾紙を一枚目の上に載せた。次に濡れたPVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に載せ、そして最後に陰極バッファ(40mMのグリシン中の25mMのトリスHCl, pH9.4)の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mMの定常電流(初期電圧は8~20ボルトに範囲した)を用いて30分で進められた。

プロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20mlのブロッキング溶液(トリス緩衝食塩水(TBS)中の1%の牛血清アルブミン(BSA)(Sigma, St. Louis, MO))を有する皿の中に入れた。TBSはPierce Chemical (Rockford, IL)より、予備秤量粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を供する。これらの膜を最少限1時間、周囲温度でブロックし、そして20mlずつの0.5%のツイーン20洗浄液(TTBB)を用いて5分間3回洗った。TTBBを調製するには、0.5mlのツイーン20(Sigma)をTBSのリッター当り混合した。使用したプローブ抗体は20mlのビオチニル化FA1D 14溶液とした(10 $\mu$ g/20mlの抗体バッファ)。抗体バッファは100mlのTTBS当り1gのBSAを加えることにより作った。周囲温度で30~60分プローブした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を周囲温度において30~60分、抗体バッファの中で1:500希釈率のアルカリホスファターゼの抱合されたストレプトアビジン(Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) 20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファ(20ml)の中で2分洗った。このバッファは0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMのMgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, pH9.8とした。アルカリホスファターゼにとっ

での基質を作るため、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)クロリド(50mg, Sigma)を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液も、Promegaよりウェスタン発色剤として市販されている。発色のため、それぞれ120μlを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色膜からそれらを水で洗い流した。

#### ビオチニル化 FAID 14

FAID 14は、CC49に対して特異的な、ATCC No. CRL10256として寄託されているネズミの抗-イデオタイプ抗体(IgG2a, Kアイソタイプ)である。FAID 14を Nygene Protein A アフィニティーカラム(Yonkers, NY)を用いて精製した。製造者のプロトコールに従ったが、ただし溶媒バッファーとして0.1Mのクエン酸ナトリウム、pH 3.0を用いた。画分を1.0Mのトリス-HCl pH 9.0を用いてpH 7に中和した。ビオチニル化反応は下記の通りに設定した。FAID 14(1mg、水の中で100μl)を100μlの0.1MのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、pH 9.6と混合した。ビオチニル-e-アミノ-カブロン酸N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA)(2.5mg)を0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。Biotin-X-NHS 溶液(20μl)をFAID 14溶液に加え、そして22℃で4時間反応させた。過剰のビオチン及び不純物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム(Piscataway, NJ)を用いてゲル濾過により除去した。0.8μl/minの流速で、ビオチニル化FAID 14は18.8minのピークで出現した。このピークを構成する画分をプールし、そして4℃で保存し、そしてCC49V<sub>h</sub>及びV<sub>h</sub>CDRにより決定

されるCC49イデオタイプを検出するのに用いた。

#### 等電点電気泳動(IEP)

等電点(pI)は、DNASTAR (Madison, WI)を介して入手できるPROTEIN-TITRATEという名のコンピュータープログラムを用いて決定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに加えてMW値が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計数は0に調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的にpIを、Isogelアガロース IEPプレート、pH域3~10(FMC Bioproducts, Rockland, ME)を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEPを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト(限界)、20mAの電流及び10Wの定常電力とした。等電点泳動は90minで完了した。IEP標準品はBioradより購入した。そのキットはフィコシアニン、β-ラクトグロブリンB、牛炭酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3レンチルレクテン及びチトクロームCを含み、それらのpI値は4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00並びに8.20及び9.60である。ゲルを、PMCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

#### CC49抗体の定量

IgG, scPv2の種および単量体scPvを含む精製CC49抗体はすべて、適合している1.0cm光路長の石英製キュベット(Hellma社)およびPerkin-Elmer UV/VIS 分光光度計552A型を用いて、タンパク質希釈液の280nm波長光の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数(E<sub>1</sub>)は、各抗体について、下記式を用いて測定した。

$$E_1 = (\text{Trp数}) \times 5,500 + (\text{Tyr数}) \times 1,340 + ((\text{Cys}) 2 \text{数}) \times 150 + (\text{Phe数}) \times 10$$

これらの値は、D.B.Watlauffer, Advances in Protein Chemistry, 17巻、375~378頁に記載されている情報に基づいている。

#### 高性能液体クロマトグラフィー

CC49scPv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全体にチタンまたはテフロン型配管を用いたLKB HPLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型制御器、276nmの吸光度に設定されたUV CORD S II 2238型検出装置および2211型SuperRac fraction collectorで構成されている。

#### サブユニットのPCRによる製造

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はすべて、150ピコグラム(pg)のプラスミド標的(pSCPVUHM); 100ピコモルのプライマー: 1μlのPerkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州、ノーウォーク所在)のAmpli-Tagポリメラーゼ; 18μlの10mM dNTPおよび10μlの10×緩衝液(両者ともにPECキットに提供されている); ならびに合計容積を100μlにするのに十分な水で構成された反応混合物で行った。PCR反応はメーカーが記載しているのとはほとんど同様にして行った。これらの反応は、PEC 9600型サーモサイクラー(thermocycler)を用いて30サイクル行ったが、その1サイクルは、94℃で20~45秒間のDNAの変性; 52~60℃で0.5~1.5分間のアニーリングおよび72℃で0.5~2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在)の380A型もしくは381型DNA合成器で合成し次いで上記のようにして精製した。

#### リゲーション

100ngのベクターDNAおよび対応する1:1化学量論的当量のインサートDNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社(米国、

カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在)のT4 DNAリガーゼキットを用い、該メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物(全容積20μl)は最初18℃でインキュベートし、次いで一夜4℃まで徐々に冷却した。

#### 形質転換

形質転換は、100μlのStratagene社の大腸菌(E. coli) AG1コンピテント細胞(米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStratagene社)を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物由来のDNA(1~5μl)を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、混合を続けながらルリアブロス(LB)中で37℃で1時間再生させ、続いて、pSCPVOHM, p49LHLHもしくはp49LHHLに用いる20μg/mLのクロラムフェニコール含有(CAM20)ルリア寒天上にプレートし、またはプラスミドpSL301を含有するクローンもしくはpSL301由来のその後の構築物に用いる100μg/mLアンピシリン(AMP100)ルリア寒天プレート(LB-AMP100)上にプレートした。

#### 大腸菌クローンのスクリーニング

細菌プラスミドは、Promega社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のMagicミニプレッププラスミド製造キットを用いて、高圧圧(selection pressure)を維持するため適切な薬剤を含有するLBブロス培養物から単離した。このキットはメーカーの取扱い説明書にしたがって使用した。

#### プラスミドの構築

p49LHLHおよびp49LHHLと命名された2種のプラスミドを、多価の一本鎖抗体を製造するために構築した。p49LHLHを含有する宿主細胞は、V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>で表すことができるポリペプチドを産生した。ここでV<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー(L)は、下記SEQ ID NO: 5の配列を有する

25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu

p49LHHLを含有する宿主細胞は、 $V_L$ - $L$ - $V_H$ - $L$ - $V_L$ - $L$ - $V_L$ で変換することができるポリペプチドを産生した。ここで $V_L$ と $V_H$ はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびは上記アミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

CC49 $V_L$ - $L$ - $V_H$ - $L$ - $V_L$ - $L$ - $V_H$ (p49LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 6)とアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7)を図6に示す。CC49 $V_L$ - $L$ - $V_H$ - $L$ - $V_H$ - $L$ - $V_L$ (p49LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 8)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 9)を図7に示す。

#### pSL301HTの構築

pSL301HTの構築を図8に示す。バシラス・リヘニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)のペニシリナーゼP (penP) ターミネーターの配列を、Nhe I および BamH I で45分間消化することによって、pSCFV UHMと命名されたプラスミドから取出し、電気泳動を行った後、4.5% ポリアクリルアミドゲルから切り取り、電気泳動させ、エタノールで沈降させ、次に、同様に製造されたベクター：pSL301 (米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社) 中の同じ部位に連結した。pSCFV UHMの製造手順は、1992年8月21日付け出願の米国特許願第07/935,695号に記載されている。なおこの出願の開示事項は本願に援用するものである。一般に、pSCFV UHMは、penPプロモーターのヌクレオチド配列；固有Nco I 制限部位；CC49 $V_L$ 領域；Hind III 制限部位；25個のアミノ酸のリンカー；固有Xho I 制限部位；CC49 $V_H$ 領域；Nhe I 制限部位；penPターミネーター；およびBamH I 制限部位を含有している(図8参照)。このpenPプロモーターとpenPターミネーターは、Mezesら、J. Biol. Chem., 258巻、

11211~11218頁、1983年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部(3  $\mu$ L)を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートし、次いで一夜増殖させたコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。penPターミネーター、インサートを含有するポテンシャルクローンを、Pharmacia社(米国、メリーランド州、ガイサーズバーグ所在)のT7 Quickprime <sup>32</sup>P DNA 標識キットと、Bulowelsら、Nucleic Acid Research, 17巻、452頁、1989年に記載されているマイクロ波によるコロニー溶解法とともに用いてスクリーニングした。プローブは、penP-Nhe I-BamH Iターミネーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによって提供された指示によって製造し使用した。陽性プローブであり、かつBamH I および Nhe I による消化物由来の207個の塩基対挿入断片(図6に示す1958~2165の塩基対(bp))を含有するクローンをpSL301Tと命名し、次いでCC49VHに対するヌクレオチド配列を含有するpSL301HTを構築するのに選択した。Nhe I-BamH I penPターミネーターをpSL301中に配置した理由は、そのNhe IとBamH Iの部位の間のポリリンカー領域中に存在するEco47III制限エンドヌクレアーゼ部位を除くためであった。このことは、Eco47III部位が、構造体中に各連続V領域を配置するのにユニークである必要がある $V_L$ と $V_H$ の領域を繞いて構築するため設計された。各V領域がEco47III-Nhe I 部位に付加されると、Eco47IIIは各場合に破壊されて、ユニーク挿入断片に入ってくる次のEco47III部位を形成した。

$V_L$ 配列は、PCR増幅の標的としてpSCFV UHMを用い、オリゴの5' SCP1と3' オリゴSCP5によってPCRで複製した。SCP1に対するDNA配列(SEQ ID NO: 10)とSCP5に対するDNA配列(SEQ ID NO: 11)は次のとおりである。

SCP1: 5' -TAAA CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG-3'

SCP5: 5' -TAAA GCT AGC ACCA AGC GCT TAG TGA GCA GAC GGT GAC TGA GCT-3'

下線をつけた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増幅された $V_H$ DNAを、4%のPAG、電気泳動、エタノールによる沈降および20  $\mu$ L水への溶解によって精製した。その $V_H$ 配列をXho IとNhe Iの制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化され続いて精製されたpSL301Tベクターに対するインサートとして用いた。標準のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4  $\mu$ L)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。CC49 $V_H$ インサートを含有していることを示す候補的クローンをNhe I およびXho I 消化スクリーンから取出した。

United States Biochemical (USB) 社(米国、オハイオ州クリーブランド所在)のSequence Kit、および配列決定用プライマーpSL301SEQB (pSL301ベクター中、Xho I 部位から57bp上流においてアニールした21bpの配列決定プライマー)とCC49VHPを用いて、DNAの配列決定を行って、CC49 $V_H$ の配列を確認し、pSL301HT中に正しいCC49 $V_H$ 配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドはpSL301-HHLLおよびpSL301-HLHTの両者を構築するときの出発点で使った。使用した配列決定用のオリゴをここに示す。

pSL301SEQB(SEQ ID NO: 12) および CC49 $V_H$  (SEQ ID NO: 13) のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQB: 5' -YCG TCC GAT TAG GCA AGC TTA-3'

CC49VHP: 5' -CAT CAT TTT AAA TAC AAT GAG-3'

#### 実施例1 p49LHHLの構築

pSL301HT (5  $\mu$ g) を出発物質として用い、これをEco47IIIおよびNhe Iで消化し、大きい方のベクターフラグメントを精製した。CC49 $V_H$ 挿入フラグメントは、5' オリゴとしてSCP5Cを用い、かつ

3' オリゴとしてSCP5を用い、PCRによって製造した。SCP5Bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 14)は下記のとおりである。

SCP5B: 5' -TAAA TGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT  
GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAC GTT CAG TTG CAG CAG  
TCT-G'

またオリゴSCP5Bはリンカーのコーディング領域の一部(SEQ ID NO: 14のbp8~76)を含有している。pSCFV UHM中のCC49VH標的のアニールするよう設計された該オリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp77~80由来のものである。

下線をつけた配列はPsp I 部位に相当する。得られたPCRインサートを精製し、Psp IとNhe Iで消化し、次いでpSL301HT Eco47III-Nhe Iベクターとのリゲーション反応に用いた(図7)。コンピテント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物(3  $\mu$ L)で形質転換を行うのに用い、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。pSL301HT生成物を示す正しい大きさのXho I-Nhe Iインサートを有する2個のクローンの配列をオリゴSQP1を用いて決定し、正しい配列(図7のヌクレオチド1124~1543)を有する単クローンをその後の構築に用いるのに選んだ。SQP1のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 16)は下記のとおりである。

SQP1: 5' -TG ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカーV、サブユニット(bp1544~1963、図7)は、5' オリゴのSCP7bと3' オリゴのSCP8aを用い、かつPCRの標的としてpSCFV UHMを用いて製造した。SCP7bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記のとおりである。

SCP7b: 5' -TAAA TGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT  
GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT  
CC



下線をつけたヌクレオチドは FspI 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18)は下記のとおりである。

SCP8a: 5' -TAAA GCT AGC TTT TTA CTT AAG CAC  
CAC CTT GGT CCC-3'

下線をつけた最初の一組は NheI 部位に相当し、もう一つの組は AflII 部位に相当する。SCP70のヌクレオチド8〜76はリンカーをコードし(図7のヌクレオチド1544〜1612)、一方V<sub>H</sub>にアニールするヌクレオチド77〜99は図7の1613〜1635に相当する。プライマー SCP8aは、その5'末端の短いテール、NheI 制限部位、終止コドン、AflII 制限部位およびV<sub>H</sub>の最後の21個の塩基を含有している。FspI と NheI による消化の後、この得られた 420bpのインサートを精製して精製pSL30HHTベクターの NheI と Eco47IIIの部位に連結し、候補的なクローンを NheI と XhoI でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつ49LFR2(−)とSQP1で配列が決定されて、pSL30IHHT中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 19)は下記のとおりである。

49LFR2(−): 5' -CTG CTG GTA CCA GGC CAA G-3'

プラスミドpSL30IHHTを XhoI および NheI で消化し、精製し、得られた1179bp V<sub>H</sub>-リンカー-V<sub>H</sub>-リンカー-V<sub>H</sub>セグメントを pSCPV UHMに連結して p49LHHLを製造した。なおこの pSCPV UHMは同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応生成物(4μl)部分を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞(Stratagene社)を形質転換し、LBCAM20 寒天プレートにプレートした。正しい制限酵素地図を有するプラスミドを含有する単クローンを、p49LHHLを含有させるために選択した。p49LHHLは、CC49多価一本鎖抗体 scFv2: V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>またはCC49scFv2 (LHHL)のpenPプロモーターとヌクレオチ

ド配列を含有している。

#### 実施例2: p49LHHLの構築

p49LHHLの構築を図11に図式的に示す。リンカーV<sub>H</sub>のサブユニットを5'オリゴのSCP7bと3'オリゴのSCP9で製造した。

SCP9: 5' -TAA AGC TAG CAC CAA GCG CTT AGT TTC  
AGC ACC AGC TTG GTC CCA G-3'

SCP7bオリゴ(ヌクレオチド8〜76)は図6のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124〜1192に相当する)および図6のV<sub>H</sub>のヌクレオチド1193〜1215に相当する。PCRに対する pSCPV UHM模範(ヌクレオチド77〜99)にアニールした。

SCP8は、NheI 部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)と Eco47III部位(第二の下線をつけたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次のV領域を受けるための pSL30IHHTを作るのに必要な制限部位である。SCP8のヌクレオチド18〜23は図6のヌクレオチド1532〜1537(リンカーの最初の2個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド24〜46は、PCRにおけるSCP8のアニール領域である図6に示すヌクレオチド1508〜1531に相当する。プラスミドpSL30IHHTを Eco47IIIと NheI で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予め FspI と NheI で処理され精製された、PCRからのリンカー-CC49V<sub>H</sub>DNAインサートと連結させる。その連結混合物(3μl)を用いて大腸菌AG1コンピテント細胞を形質転換し、次いで正しい XhoI - NheI の大きさのフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴ PENPTSEQ2を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 21)は下記のとおりである。

5' -TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G-3'

配列決定の結果は、得られたpSL30IHHTクローン中に PCRの誤まり

と欠失があるということを示した。図6にみられるヌクレオチド1533〜1537に相当する5個の塩基の欠失がみとめられ、そしてTであるべきはずのヌクレオチド1531はDNA配列のデータから確認したところ実際にはGであった。得られた配列は、

5' ...GAAGCGCTT...であった。

こゝで下線をつけた配列は偶然に Eco47III部位を形成した。図6のAGCGCTの配列はヌクレオチド1530, 1531, 1532, 1538, 1539および1540に相当する。この誤まりは次のステップで修正され、オリゴSCP8Cの末端に5塩基の欠失を組込むことによってpSL30IHHTを製造した。

SCP8C: 5' -TAAGCGCTGATGATGCTAAGAAGGACGCCGCAAAAAA  
GGACGACGCCAAAAAAGATGATGCAAAAAAGGATCTGG  
AGGTTCAAGTTGACAGCAGTCTGAC-3'

SCP8C中の下線をつけた配列は Eco47III部位に相当する。PCRにおいて、SCP8Cは6'オリゴとして用いられ一方SCP10は3'オリゴとして用いられて、リンカー CC49V<sub>H</sub>セグメントが生成する。SCP10のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 23)は下記のとおりである。

SCP10: 5' -TTG TGC TAG CTT TTT ATG AGG AGA CGG TGA  
CTG AGG TT-3'

SCP10中の下線をつけた配列は図6のヌクレオチド1958〜1963に見られる NheI 部位に相当する。この場合、PCRインサートはNheI だけで消化され次いで精製される。ベクター(pSL30IHHT)はEco47III部位(先に形成されている)および NheI 部位で消化され次いで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3μl)を使ってコンピテント イー・コリAG1細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB-AMP100プレート上にプレートし次いで候補的クローンを XhoI と NheI でスクリーニングした。正しい大きさ

のDNAを有する3個のクローンを得た。これらのクローンのうちの2個は、オリゴ49VLCDR3(+)およびSQP1を用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列(49VLCDR3(+))のDWQ ID NO: 24)は下記のとおりである。

49VLCDR3(+): 5' -CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図8のヌクレオチド1533〜1963からの配列が確認され、正しいpSL30IHHTクローンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHHLを製造するために、pSL30IHHT(5μg)を NheI と XhoI で消化し、次いでV<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>配列を含有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCPV UHM(5μg)を XhoI と NheI で消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記連結混合物の一部(4μl)を使ってコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物をLB-CAM20 プレート上にプレートし、次いで p49LHHLに対する代表的なクローンを、正しい制限酵素地図(図10参照)および TAG-72に対する生物活性に基づいて選択した。

#### 実施例3 CC49 scFv2のLHHLとLHHLが共有結合した二量体の精製

CC49の共有結合した一本鎖二量体(scFv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラズマ細胞質の画分を、p49LHHLと p49LHHLの両者の1.0Lの一夜培養物から調製した。要約すると、培養物を250mlづつの4部分に分割し、Sorvall GS-3ロータで10分間5000rpmで遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaClを含有する10mMトリス-HCl pH 7.3からなる100ml中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計100mlの30mMトリス-HCl pH 3で洗浄し、そして一つのチューブにブールした。このチューブに、40w/v%

のスクロースを含有する30mMトリス-HCl pH 7.3(100mL)および10mM EDTA pH 7.5(2.0mL)を添加した。得られた混合物を、時々振盪しながら、室温に10分間保持した。高張性細胞(hypertonic cell)を前記のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mLの氷冷 0.5mM MgCl<sub>2</sub>中に速やかに懸濁させ、次いで時々振盪しながら氷上に10分間保持した。その細胞を前記のようにしてペレット化し、大腸菌の周辺細胞質の画分を含有する上澄み液を、0.2μmのNalge社(米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在)の濾過装置で濾過することによってさらに清澄にし、次いでAmicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)のCentriprep 30およびCentricon 30で1.0mLより小さい容積まで濃縮した。

p49LHLHまたはp49LHHLのクローン由来の濃縮周辺細胞質のショック(shockate)を、Pharmacia社(米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ所在)のSuperdex 75 HR 10/30 HPLCカラム(予めPBSで平衡化させたもの)に注入した。競合ELISA法で測定する場合、問題の生成物は0.5mL/分の流量で21~24分間放出させた。活性画分をブールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、システム500 Microdialyzer Unit(Pierce Chemical社)を用い、緩衝液を3~4回変えながら8000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリス-HCl pH 7.6に対して一夜透析を行った。その試料をPharmacia社のMono Q HR 5/5アニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mMトリス-HCl pH 7.6を用い、緩衝液Bとして20mMトリス-HCl pH 7.6+0.5M NaClを用いる勾配プログラムを、1.5mL/minの流量で使用した。問題の生成物は、競合ELISA法で測定する場合、各々3~4分間カラムから放出させた。この時点の画分の、二つのSDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクーマシーブリリアン

トブルーR250で染色し、他方のゲルはウェスタン分析(ブローブ抗体としてビオチニル化 PAID 14を使用)に移されたが、scFv2(LHLHまたはLHHL)の種の計算分子量の単一バンドが、58,239ダルトンの位置に出現した。活性画分は各場合濃縮し、50mM MES pH 5.8に対して一夜透析し、次いでPharmacia社のMono S HR 5/5カチオン交換カラムに注射した。この精製ステップからの問題の二つの画分の5と6は、SDS-PAGE法およびELISA法で測定する場合、勾配液の使用が開始される直前に溶出された。したがってこれらの画分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで画分5と6はさらに精製するためにブールした。

Mono Qカラムを活性Mono S画分について再度使用したが使用した緩衝液は20mMトリス-HCl pH 8.0であり、流量は0.8mL/分に低下させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5~6分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

#### 等電点電気泳動

構築物の等電点(pI)はDNASTAR社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のコンピュータプログラム Protein-tiltateを使用して予測した。アミノ酸組成、MWおよびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、FMC Bioproducts社(米国、メイン州、ロックランド所在)のIsogel IEPプレートpH範囲3~10を使用して測定した。上記IEPを操作するために、Biorad社(米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在)の電気泳動装置を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mAで500V(限定)および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は90分間で完了した。Biorad社のIEP標準品は、フィコシアニン、βラクトグロ

ブリンB、ウシカルボニックアンヒドラーゼ、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒラマメレクチンおよびシトクロムCが含有され、pI値はそれぞれ4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50, 7.8, 8.00, 8.20および8.6であった。ゲルはFMCの指示にしたがって染色し脱色した。DNASTARプログラムによって両方のscFv2の種のpI値として8.1の値が予測された。純品の生成物に対し単一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の8.9の位置にみとめられた。

IgG, scFv2(LHLHおよびLHHL)のような精製CC49抗体は、280nm波長光の吸光度を分光光学的に測定することによって定量した。モル吸光係数値E<sub>m</sub>は各々、先に引用したWetlawferの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG, CC49scFv2LHLH, CC49scFv2LHHLおよびCC49scFvのE<sub>m</sub><sup>280nm</sup>(280nm)値はそれぞれ1.49, 1.65, 1.65および1.71であった。

#### 実施例4

CC49scFv2の種のLHLHとLHHLの相対活性を、IgGおよびCOOH末端にFLAGペプチドを有する単量体scFv型と比較した。

パーセント競合(percent competition)を下式によってELISAのデータから求めた。

$$\frac{\text{ゼロ競合}-\text{試料競取り値}(OD\ 405-450\text{nm})}{\text{ゼロ競合}-100\% \text{競合}} \times 100$$

“ゼロ競合(zero competition)”値は、1%BSAをビオチニル化CC49(3×10<sup>-14</sup>モル)と1:1比率で混合して測定し、一方100%競合値はビオチニル化CC49IgGと混合したCC49IgGの5μg/mL試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は405nm~450nmで測定した。3回の競取り値の平均値を使

用した。最初に試料(25μL)を、TAG-72でコートしたマイクロリットルプレートに、1.0×10.10モルの結合部位/mLで塗布した。ビオチニル化CC49(4μg/μl:20,000に希釈、25μl使用)で試料を1/2濃度に希釈した。連続希釈法(1:2)を行った。両方の形態のscFv2はIgGにほゞ等しい(図11参照)。別の試験で、CC49scFv単量体をFabフラグメントと比較した。両者は一価であるが、これらはTAG-72に対する結合アフィニティーが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの充分に機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の種に比べて全IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、そのCC49IgGの親と同様に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および一層迅速な生体分布薬物動態の利点を有することを示している。この利点によって、既存のIgG分子に比べて、本発明の化合物は多数回注射することができ、かつ癌治療に用いる免疫治療法において腫瘍:組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施態様は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を実施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の真の適用範囲と思想は以下の特許請求の範囲によって示される。

以上

FIGURE 1

共有及び非共有結合型一本鎖F<sub>2</sub>多量体の図解

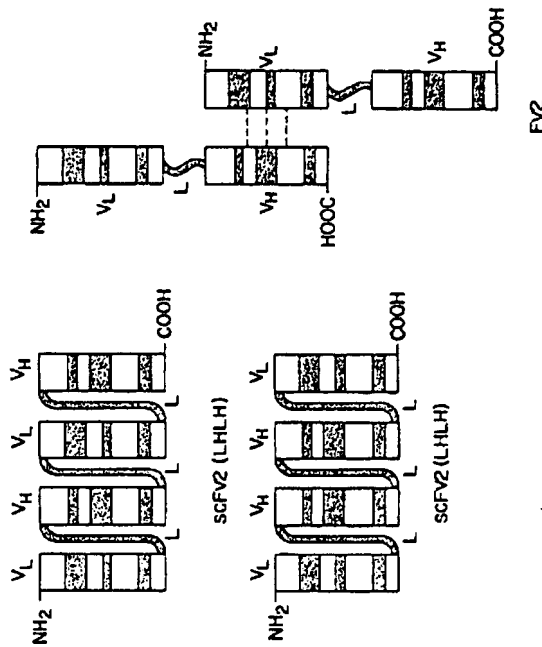


FIG. 2

GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA  
GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG AGC  
CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TCG TAC  
CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATT TAC TCG  
GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC  
ACT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GPG  
AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT  
AGC TAT CCC CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG CTG CTG  
AAG

FIG. 3

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val  
Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu  
Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg  
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala  
Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly  
Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

FIG. 4

GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT  
GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC  
TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TCG GTG AAA CAG AAC CCT GAA  
CAG GGC CTG GAA TCG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT CAT  
GAT TTT AAA TAC AAT CAG AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG  
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC GTG CAG CTC AAC  
AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA ACA  
TCC CTG AAT ATG GCC TAC TCG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC  
GTC TCC TCA

FIG. 5

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly  
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu  
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr  
Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser  
Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp  
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

特許 (内容に変更なし)

FIGURE 6

CCGG VL-L-VH-L-VL-L-VH-DNA/RUP-M/配列

5'-C TCA TGT TTG ACA GGT TAT CAT CGA TCA ATT GCA TCA CTT GCC TCC 46  
GTT CAT TTG TCC CCG GTG GAA ACG AGG TCA TCA TTT CTT TCC GAA AAA 94  
ACG GTT GCA TTT AAA TCT TAC ATA TAT AAT ACT TTC AAA GAC TAC ATT 142  
TGT AAG ATT TCA TGT TTG AGT CCG CTG AAA CAT CGT ACG TAC CAA TTA 190  
TTG TTT CGT GAT TGT TCA ACC CAT AAT CTA TTA TTA TTA TTA TTA TTA 238  
GTG CTT CAT CTG GTT ACG ATC AAT CAA ATA TTC AAA CCG AGG GAG ACG 286  
ATT TTG ATG AAA TAC TTG CTT ACG GCA GGC GGT GGT TTA TTA TTA 334  
Leu Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Ile Val Met Ser Gln Ser Pro 382  
CTC GCT GCC CAA GCA GGC ATG GGC GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA 430  
Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys 478  
TCC TCC CTA CTA CTA CTA CTA CTA CTA CTA CTA CTA CTA CTA CTA CTA  
Ser Ser Cln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala  
TCC ACT CAG ACC CTT TTA TAT ACT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC

FIG. 6D

240  
 Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
 TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GCA ACC TCA  
 250  
 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Lys Asp Ala Ala  
 GTC ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT  
 260  
 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Lys Asp Ala Ala  
 AAA AAA GAC GAT GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT GTT GAC ATT  
 270  
 Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys  
 GTC ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CTT GTC TCA GTT GGC GAG AAG  
 280  
 Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn  
 GTT ACT TTG ACC TGC AAG TGC AGT CAG AGC CTT TTA TAT ACT GGT AAT  
 290  
 Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GCG CAG TCT CCT  
 300  
 310  
 320  
 330

FIG. 6B

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp  
 TGG TAC CAG CAG AAA CCA GCG CAG TCT CCT AAA CTC CTG ATT TAC TGG  
 50  
 Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly  
 GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT GCG TTC ACA GGC AGT GCA  
 60  
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Gln Asp  
 TCT GCG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT GAA GAC  
 70  
 Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe  
 CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCC CTC ACG TTC  
 80  
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys  
 GGT GCT GCG ACC AAG CTG CTG AAG CTT AGT GCG GAC GAT GCG AAA  
 90  
 100  
 110  
 120  
 130  
 Lys Asp Ala Ala Lys Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys  
 AAG GAT GCT GCG AAG AAG AAG GAT GAC GCT AAG AAA CAC GAT GCT AAA AAG  
 140  
 150  
 160  
 170  
 180  
 190  
 200  
 210  
 220  
 230  
 240  
 250  
 260  
 270  
 280  
 290  
 300  
 310  
 320  
 330

FIG. 6E

330  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp  
 AAA CTG CTG ATT TAC TGG GCA TCC GCT AGG GAA TCT GCG GTC CCT GAT  
 340  
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser  
 CGC TTC ACA GCG AGT GGA TCT GCG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC  
 350  
 Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr  
 AGT GTG AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT  
 360  
 AGC TAT  
 370  
 380  
 390  
 400  
 410  
 420  
 430  
 440  
 450  
 460  
 470  
 480  
 490  
 500  
 510  
 520  
 530  
 540  
 550  
 560  
 570  
 580  
 590  
 600  
 610  
 620  
 630  
 640  
 650  
 660  
 670  
 680  
 690  
 700  
 710  
 720  
 730  
 740  
 750  
 760  
 770  
 780  
 790  
 800  
 810  
 820  
 830  
 840  
 850  
 860  
 870  
 880  
 890  
 900  
 910  
 920  
 930  
 940  
 950  
 960  
 970  
 980  
 990  
 1000  
 1010  
 1020  
 1030  
 1040  
 1050  
 1060  
 1070  
 1080  
 1090  
 1100  
 1110  
 1120  
 1130  
 1140  
 1150  
 1160  
 1170  
 1180  
 1190  
 1200  
 1210  
 1220  
 1230  
 1240  
 1250  
 1260  
 1270  
 1280  
 1290  
 1300  
 1310  
 1320  
 1330  
 1340  
 1350  
 1360  
 1370  
 1380  
 1390  
 1400  
 1410  
 1420  
 1430  
 1440  
 1450  
 1460  
 1470  
 1480  
 1490  
 1500  
 1510  
 1520  
 1530  
 1540  
 1550  
 1560  
 1570  
 1580  
 1590  
 1600  
 1610  
 1620  
 1630  
 1640  
 1650  
 1660  
 1670  
 1680  
 1690  
 1700  
 1710  
 1720  
 1730  
 1740  
 1750  
 1760  
 1770  
 1780  
 1790  
 1800  
 1810  
 1820  
 1830  
 1840  
 1850  
 1860  
 1870  
 1880  
 1890  
 1900  
 1910  
 1920  
 1930  
 1940  
 1950  
 1960  
 1970  
 1980  
 1990  
 2000  
 2010  
 2020  
 2030  
 2040  
 2050  
 2060  
 2070  
 2080  
 2090  
 2100  
 2110  
 2120  
 2130  
 2140  
 2150  
 2160  
 2170  
 2180  
 2190  
 2200  
 2210  
 2220  
 2230  
 2240  
 2250  
 2260  
 2270  
 2280  
 2290  
 2300  
 2310  
 2320  
 2330  
 2340  
 2350  
 2360  
 2370  
 2380  
 2390  
 2400  
 2410  
 2420  
 2430  
 2440  
 2450  
 2460  
 2470  
 2480  
 2490  
 2500  
 2510  
 2520  
 2530  
 2540  
 2550  
 2560  
 2570  
 2580  
 2590  
 2600  
 2610  
 2620  
 2630  
 2640  
 2650  
 2660  
 2670  
 2680  
 2690  
 2700  
 2710  
 2720  
 2730  
 2740  
 2750  
 2760  
 2770  
 2780  
 2790  
 2800  
 2810  
 2820  
 2830  
 2840  
 2850  
 2860  
 2870  
 2880  
 2890  
 2900  
 2910  
 2920  
 2930  
 2940  
 2950  
 2960  
 2970  
 2980  
 2990  
 3000  
 3010  
 3020  
 3030  
 3040  
 3050  
 3060  
 3070  
 3080  
 3090  
 3100  
 3110  
 3120  
 3130  
 3140  
 3150  
 3160  
 3170  
 3180  
 3190  
 3200  
 3210  
 3220  
 3230  
 3240  
 3250  
 3260  
 3270  
 3280  
 3290  
 3300  
 3310  
 3320  
 3330  
 3340  
 3350  
 3360  
 3370  
 3380  
 3390  
 3400  
 3410  
 3420  
 3430  
 3440  
 3450  
 3460  
 3470  
 3480  
 3490  
 3500  
 3510  
 3520  
 3530  
 3540  
 3550  
 3560  
 3570  
 3580  
 3590  
 3600  
 3610  
 3620  
 3630  
 3640  
 3650  
 3660  
 3670  
 3680  
 3690  
 3700  
 3710  
 3720  
 3730  
 3740  
 3750  
 3760  
 3770  
 3780  
 3790  
 3800  
 3810  
 3820  
 3830  
 3840  
 3850  
 3860  
 3870  
 3880  
 3890  
 3900  
 3910  
 3920  
 3930  
 3940  
 3950  
 3960  
 3970  
 3980  
 3990  
 4000  
 4010  
 4020  
 4030  
 4040  
 4050  
 4060  
 4070  
 4080  
 4090  
 4100  
 4110  
 4120  
 4130  
 4140  
 4150  
 4160  
 4170  
 4180  
 4190  
 4200  
 4210  
 4220  
 4230  
 4240  
 4250  
 4260  
 4270  
 4280  
 4290  
 4300  
 4310  
 4320  
 4330  
 4340  
 4350  
 4360  
 4370  
 4380  
 4390  
 4400  
 4410  
 4420  
 4430  
 4440  
 4450  
 4460  
 4470  
 4480  
 4490  
 4500  
 4510  
 4520  
 4530  
 4540  
 4550  
 4560  
 4570  
 4580  
 4590  
 4600  
 4610  
 4620  
 4630  
 4640  
 4650  
 4660  
 4670  
 4680  
 4690  
 4700  
 4710  
 4720  
 4730  
 4740  
 4750  
 4760  
 4770  
 4780  
 4790  
 4800  
 4810  
 4820  
 4830  
 4840  
 4850  
 4860  
 4870  
 4880  
 4890  
 4900  
 4910  
 4920  
 4930  
 4940  
 4950  
 4960  
 4970  
 4980  
 4990  
 5000  
 5010  
 5020  
 5030  
 5040  
 5050  
 5060  
 5070  
 5080  
 5090  
 5100  
 5110  
 5120  
 5130  
 5140  
 5150  
 5160  
 5170  
 5180  
 5190  
 5200  
 5210  
 5220  
 5230  
 5240  
 5250  
 5260  
 5270  
 5280  
 5290  
 5300  
 5310  
 5320  
 5330  
 5340  
 5350  
 5360  
 5370  
 5380  
 5390  
 5400  
 5410  
 5420  
 5430  
 5440  
 5450  
 5460  
 5470  
 5480  
 5490  
 5500  
 5510  
 5520  
 5530  
 5540  
 5550  
 5560  
 5570  
 5580  
 5590  
 5600  
 5610  
 5620  
 5630  
 5640  
 5650  
 5660  
 5670  
 5680  
 5690  
 5700  
 5710  
 5720  
 5730  
 5740  
 5750  
 5760  
 5770  
 5780  
 5790  
 5800  
 5810  
 5820  
 5830  
 5840  
 5850  
 5860  
 5870  
 5880  
 5890  
 5900  
 5910  
 5920  
 5930  
 5940  
 5950  
 5960  
 5970  
 5980  
 5990  
 6000  
 6010  
 6020  
 6030  
 6040  
 6050  
 6060  
 6070  
 6080  
 6090  
 6100  
 6110  
 6120  
 6130  
 6140  
 6150  
 6160  
 6170  
 6180  
 6190  
 6200  
 6210  
 6220  
 6230  
 6240  
 6250  
 6260  
 6270  
 6280  
 6290  
 6300  
 6310  
 6320  
 6330  
 6340  
 6350  
 6360  
 6370  
 6380  
 6390  
 6400  
 6410  
 6420  
 6430  
 6440  
 6450  
 6460  
 6470  
 6480  
 6490  
 6500  
 6510  
 6520  
 6530  
 6540  
 6550  
 6560  
 6570  
 6580  
 6590  
 6600  
 6610  
 6620  
 6630  
 6640  
 6650  
 6660  
 6670  
 6680  
 6690  
 6700  
 6710  
 6720  
 6730  
 6740  
 6750  
 6760  
 6770  
 6780  
 6790  
 6800  
 6810  
 6820  
 6830  
 6840  
 6850  
 6860  
 6870  
 6880  
 6890  
 6900  
 6910  
 6920  
 6930  
 6940  
 6950  
 6960  
 6970  
 6980  
 6990  
 7000  
 7010  
 7020  
 7030  
 7040  
 7050  
 7060  
 7070  
 7080  
 7090  
 7100  
 7110  
 7120  
 7130  
 7140  
 7150  
 7160  
 7170  
 7180  
 7190  
 7200  
 7210  
 7220  
 7230  
 7240  
 7250  
 7260  
 7270  
 7280  
 7290  
 7300  
 7310  
 7320  
 7330  
 7340  
 7350  
 7360  
 7370  
 7380  
 7390  
 7400  
 7410  
 7420  
 7430  
 7440  
 7450  
 7460  
 7470  
 7480  
 7490  
 7500  
 7510  
 7520  
 7530  
 7540  
 7550  
 7560  
 7570  
 7580  
 7590  
 7600  
 7610  
 7620  
 7630  
 7640  
 7650  
 7660  
 7670  
 7680  
 7690  
 7700  
 7710  
 7720  
 7730  
 7740  
 7750  
 7760  
 7770  
 7780  
 7790  
 7800  
 7810  
 7820  
 7830  
 7840  
 7850  
 7860  
 7870  
 7880  
 7890  
 7900  
 7910  
 7920  
 7930  
 7940  
 7950  
 7960  
 7970  
 7980  
 7990  
 8000  
 8010  
 8020  
 8030  
 8040  
 8050  
 8060  
 8070  
 8080  
 8090  
 8100  
 8110  
 8120  
 8130  
 8140  
 8150  
 8160  
 8170  
 8180  
 8190  
 8200  
 8210  
 8220  
 8230  
 8240  
 8250  
 8260  
 8270  
 8280  
 8290  
 8300  
 8310  
 8320  
 8330  
 8340  
 8350  
 8360  
 8370  
 8380  
 8390  
 8400  
 8410  
 8420  
 8430  
 8440  
 8450  
 8460  
 8470  
 8480  
 8490  
 8500  
 8510  
 8520  
 8530  
 8540  
 8550  
 8560  
 8570  
 8580  
 8590  
 8600  
 8610  
 8620  
 8630  
 8640  
 8650  
 8660  
 8670  
 8680  
 8690  
 8700  
 8710  
 8720  
 8730  
 8740  
 8750  
 8760  
 8770  
 8780  
 8790  
 8800  
 8810  
 8820  
 8830  
 8840  
 8850  
 8860  
 8870  
 8880  
 8890  
 8900  
 8910  
 8920  
 8930  
 8940  
 8950  
 8960  
 8970  
 8980  
 8990  
 9000  
 9010  
 9020  
 9030  
 9040  
 9050  
 9060  
 9070  
 9080  
 9090  
 9100  
 9110  
 9120  
 9130  
 9140  
 9150  
 9160  
 9170  
 9180  
 9190  
 9200  
 9210  
 9220  
 9230  
 9240  
 9250  
 9260  
 9270  
 9280  
 9290  
 9300  
 9310  
 9320  
 9330  
 9340  
 9350  
 9360  
 9370  
 9380  
 9390  
 9400  
 9410  
 9420  
 9430  
 9440  
 9450  
 9460  
 9470  
 9480  
 9490  
 9500  
 9510  
 9520  
 9530  
 9540  
 9550  
 9560  
 9570  
 9580  
 9590  
 9600  
 9610  
 9620  
 9630  
 9640  
 9650  
 9660  
 9670  
 9680  
 9690  
 9700  
 9710  
 9720  
 9730  
 9740  
 9750  
 9760  
 9770  
 9780  
 9790  
 9800  
 9810  
 9820  
 9830  
 9840  
 9850  
 9860  
 9870  
 9880  
 9890  
 9900  
 9910  
 9920  
 9930  
 9940  
 9950  
 9960  
 9970  
 9980  
 9990  
 10000

特許(内容に変更なし)

FIGURE 7

CC49 VL-L-VH-L-VH-L-VLのDNA及びアミノ酸配列

5'-C TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT CGA TCA ATT CGA TCA CTT CCG TCG 46  
GTT CAT TTG TCC CGG GTG GAA ACG AGG TCA TCA TTT CTT TCC GAA AAA 94  
ACG GTT GCA TTT AAA TCT TAC ATA TAT AAT ACT TTC AAA GAC TAC ATT 142  
TGT AAG ATT TGA TGT TTG AGT CGG GTG AAA GAT COT ACG TAC CAA TTA 190  
TTG TTT CGT GAT TGT TCA ACG CAT AAC ACT GTA GGG ATA GTG GAA AGA 238  
GTG CTT CAT CTG GTT ACG ATC AAT CAA ATA TTC AAA CCG ACG GAG ACG 286  
FEMPE2- TAT AAG TTT CCG TCC CTC TG  
-22 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Gly Leu Leu Leu  
ATT TTG ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCG GCT GGA TTG TTA TTA 334  
Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro  
CTC GCT CCG CAA CCA GCG ATG GCG GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA 382  
Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys  
TCC TCG CTA CCT GTG TCA GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG ACG TGC AAG 430

FIG. 7B

Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala 40  
TCC AGT CAG ACG CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCG 478  
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp  
TGG TAC CAG CAG AAA CCA GCG CAG TCT GCT AAA CTG CTG ATT TAC TCG 526  
Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly 70  
GCA TCC GCT ACG GAA TCT CGG GTG CCT GAT GCG TTC ACA GGC AGT GGA 574  
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp 80  
TCT GCG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC ACG AGT GTG AAG ACT GAA GAC 622  
Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Pro Leu Thr Phe 100  
CTG GCA CTT TAT TAC TCT CAG CAG TAT TAT ACC TAT CCG CTC ACG TTC 670  
Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Lys Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys 120  
GGT CCT GCG ACC AAG CTG GTG AAG CTT AGT GCG GAC GAT GCG AAA 718  
Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys 130  
AAG GAT CCT CCG AAG AAG GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT 766  
TTC CTA CCA CCG TTC TTC CTA THNVL(-)SEQ

FIG. 6F

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn 1726  
TCT GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC  
460 470  
Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp  
CCT GAA CAG GCG CTG GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT 1774  
480  
Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala 1822  
GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC AAG GCG AAG GCG ACA CTG ACT GCA  
490 500  
Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser  
GAC AAA TCC TCC ACG ACT GCG TAC GTG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT 1870  
510 520  
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr  
CAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GCG TAC 1918  
530  
Tyr Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser \*\*\* Nhe I  
TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTG TCC TCA TAA AAA GCT AGC GAT 1966

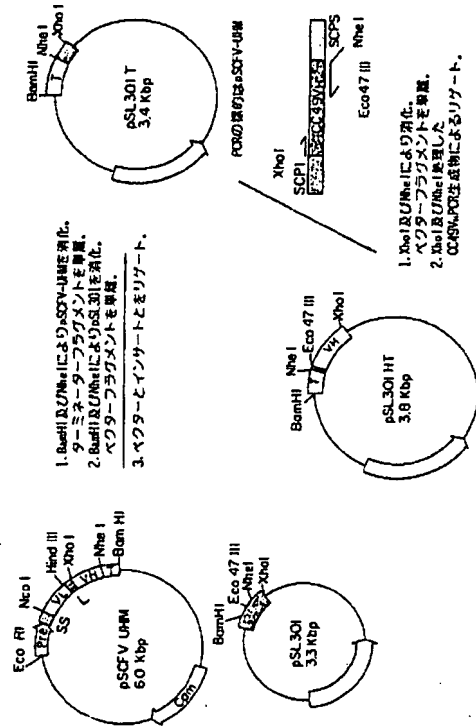
FIG. 6G

GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT 2014  
SQP1- TGT AGT AGA ATG TAT TTC AGT  
PENTISEQ2- G TAT TTC AGT GAA CCA CTA GTT  
CAT ATC ATT GTC CGG CAA TGG TGT GGG CTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT 2062  
AAA GAT CAT GTG AAG AAA AAC GGG AAA ATC GGT CTG CGG GAA AGG ACC 2110  
GGG TTT TTG TCG AAA TCA TAG GCG AAT GCG TTG GAT TGT GAC AAA ATT 2158  
BamH I  
CGG ATC C-3' 2165



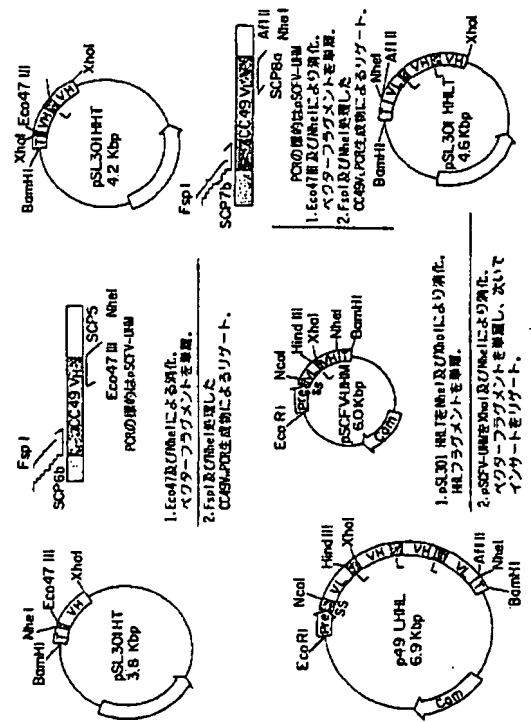
特許(内容に変更なし)

FIGURE 8



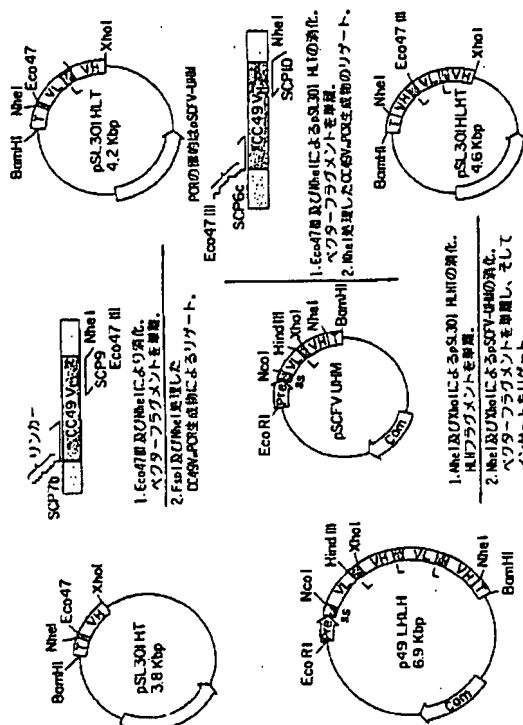
特許(内容に変更なし)

FIGURE 9



特許(内容に変更なし)

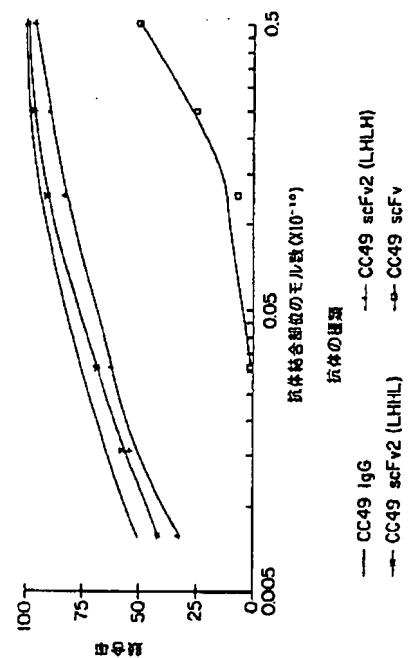
FIGURE 10



特許(内容に変更なし)

FIGURE 11

CC49 IgG, scFv2 & scFvの融合アッセイ  
融合因子: ヒストニル化CC49 IgG



平成6年9月1日

特許庁長官 高 島 景 殿

## 1. 事件の表示

PCT/US93/12039

## 2. 発明の名称

多価の一本鎖抗体

## 3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

名称 ザ ダウ ケミカル カンパニー

## 4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル

貴和特許法律事務所 電話 3504-0721

氏名 井堀士(7751) 石 田 敬

## 5. 補正命令の日付

自発補正

## 6. 補正の対象

(1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文

(2) 図面の翻訳文

(3) 委任状

## 7. 補正の内容

(1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文の浄書(内容に変更なし)

(2) 図面の翻訳文の浄書(内容に変更なし)

(3) 別紙の通り



## 国際調査報告

Date of Appointment for  
PCT/US 93/12039

1. CLASSIFICATION BY THE SEARCH AUTHORITY IPC 5 C12N15/28 C12N15/62 A61K39/395		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC 2. FIELD OF THE INVENTION IPC 5 C12N C07K		
Description of the invention (classification system assigned by classification system) IPC 5 C12N C07K		
Disclaimers proposed under the description (indicate in the description that such disclaimers are included in the text)		
Examiner has been involved during the examination (mark in the description that such involvement has occurred in the text)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the language	Reference to class No.
X	WO, A, 91 19739 (CELLTECH LIMITED) 26 December 1991 see example 1	1, 5
Y	CANCER RESEARCH vol. 52, no. 12, 15 June 1992, PHILADELPHIA, PA, USA pages 3402 - 3408 T. YOKOTA ET AL. 'Rapid tumour penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms' see page 3403, column 1, paragraph 4	2-4, 6 1, 6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the examination of the C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in class No.		
Special categories of cited documents: 'A' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'B' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'C' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'D' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'E' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'F' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'G' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'H' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'I' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'J' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'K' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'L' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'M' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'N' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'O' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'P' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'Q' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'R' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'S' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'T' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'U' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'V' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'W' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'X' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'Y' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance) 'Z' documents (where the priority date of the cited document is not considered to be of particular relevance)		
Date of the latest completion of the examination		Date of mailing of the examination report
25 March 1994		27 -04- 1994
Please see mailing address of the ISA International Patent Office, P.O. Box 101 CH-1015, 1015 Avenue de la Gare Tel. (+41-22) 319 1111, Telex 31 011 opt 01 Fax (+41-22) 319 1111		Attached office Cupido, H

Form PCT/IB/28 (1) (English) (July 1992)

## 国際調査報告

Date of Appointment for  
PCT/US 93/12039

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the language	Reference to class No.
Y	BIOCHEMISTRY vol. 30, no. 42, 22 October 1991, EASTON, PA, US pages 10117 - 10125 M.V. PANTOLIANO ET AL. 'Conformational stability, folding and ligand-binding affinity of single-chain Fv immunoglobulin fragments expressed in Escherichia coli' cited in the application see page 10120, column 1, paragraph 2	2, 4
X	EP, A, 0 506 124 (TANOX BIOSYSTEMS, INC.) 30 September 1992 see example 1	1, 5
P, X	WO, A, 93 11161 (ENZON, INC.) 10 June 1993 see figure 19A	1, 5-6

Form PCT/IB/28 (1) (English) (July 1992)

## 国際調査報告

Date of Appointment for  
PCT/US 93/12039

Priority document used to search report	Publication date	Priority document (number)	Publication date
WO-A-9119739	26-12-91	AU-A- 7983191	07-01-92
		EP-A- 0486652	27-05-92
		GB-A- 2250995	24-08-92
		JP-T- 5602039	15-04-93
EP-A-0506124	30-09-92	AU-B- 640563	02-09-93
		AU-A- 1299292	15-10-92
		JP-A- 5117164	14-05-93
WO-A-9311161	10-06-93	AU-A- 3178993	28-05-93

Form PCT/IB/28 (1) (English) (July 1992)



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 K 16/46		8318 -4H	
C 1 2 N 15/09	Z N A		
//(C 1 2 P 21/08			
C 1 2 R 1:19)			

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)1月13日

【公表番号】特表平7-503622

【公表日】平成7年(1995)4月20日

【年通号数】

【出願番号】特願平6-514437

【国際特許分類第6版】

C12P 21/08

C07K 16/00

16/18

16/32

16/46

C12N 15/09 ZNA

//C12P 21/08

C12R 1:19 )

【F I】

C12P 21/08 9358-4B

C07K 16/00 9356-4H

16/18 9356-4H

16/32 9356-4H

16/46 9356-4H

C12N 15/00 ZNA A 9282-4B

手 続 補 正 書

平成9年 7 月 2 日

明 細 書

多価の一本鎖抗体

特許庁長官 光 井 秀 光 殿

## 1. 事件の表示

平成6年特許願第5114437号

## 2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ザ ダウ ケミカル カンパニー

## 3. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目とさ1号 虎ノ門37森ビル

青和特許法律事務所 電話 03-5470-1930

氏名 弁護士(7151) 石 田 敬

## 4. 補正対象書類名

明細書及び請求の範囲

## 5. 補正対象項目名

明細書及び請求の範囲

## 6. 補正の内容

- (1) 明細書を別紙の通り補正します。  
 (2) 請求の範囲を別紙の通り補正します。

## 7. 添付書類の目録

- (1) 明 細 書 1 冊  
 (2) 請求の範囲 1 冊

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に反応して免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四量体、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>と称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクター機能をもたらす。

アミノ酸配列データは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保守されたフレームワーク領域(FR)によりフラグメントされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造保存性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると想定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは5本の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は診断及び治療剤の両方として有用とされている。モノクローナル抗体は、誘導された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエローマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより巨量的に製造される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断にとってのベスト抗体の検出は、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗マウス抗体応答に基づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の鎖に由来する抗体の結合又は可変領域が別の鎖に出

来する抗体の定常領域と組色されたものが従来 KLA方法論により作られている。例えば、Ashkenaziら、J. Immunol., 137: 1060-1074 (1986) ; Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1985) ; Nishimuraら、Cancer Res., 47: 909-910 (1987) ; 及び Lieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 9439-9443 (1987) を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開示している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その基型動力学に影響を及ぼすタンパク質構造全体のうちの主要部分を覆うFc領域を喪失している。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、寧ろ細胞に迅速に集中し、且つ結合する抗原分子を得ること、及び未結合の物質が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管透過性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV<sub>H</sub>と一本のV<sub>L</sub>とにより一本鎖抗体フラグメント(scFv)が作られており、これは6つのCDRを含む。それらはペプチドリンカー(米国特許第4,316,578号)により連結されたV<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>ポリペプチドで成っており、ここでLはペプチドリンカーを表している。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインが両方V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>であるscFvが米国特許第5,132,405号に開示されている。

完全抗体としての最少限の2つの結合部位と比べてscFvは一つのそれを有するため、scFvは2以上の結合部位を含む抗体に比べて低い活性を有している。

従って、このポリペプチドの活性を高めるため、凡そその抗原認識特性を維持又は高めるため、複数の結合部位を有するscFvの構築物を獲得することが有利であろう。加えて、機能的組織上の別々のエピソードの隠蔽を可能とする、別の免疫エフェクター機能の抗体ベース増強を可能とする、又は抗原もしくは診断成分の抗体検出を可能とする二価特異的である多価scFvを獲得することが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本のV<sub>H</sub>と一本のV

Lドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第二ペプチドリンカーによって共有結合されて、完全抗体の結合能力を維持している多価一本鎖抗体を形成できることが発見された。一態様において、本発明は抗原に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は2本以上の軽鎖可変ドメインと2本以上の重鎖可変ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の態様において、本発明は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。

別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードするDNA配列を発生し、ここでこの多価の一本鎖抗体は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第二ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；

を含んで成る。

この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいても小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が2種類の抗原決定基であらうる多価一本鎖抗体の構築も可能とするであろう。

#### 図解の簡便な説明

図1は、V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub> (LHL3) と V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub> (LHL4) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型二一本鎖抗体(Fv2)を示す。

図2は CC49V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 1) のヌクレオチド配列を示す。

図3は CC49V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 2) のアミノ酸配列を示す。

図4は CC49V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 3) のヌクレオチド配列を示す。

図5は CC49V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を示す。

図6は p49LHL1 (SEQ ID NO: 6) におけるCC49一本鎖抗体LHL1のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図7は p49LHL1 (SEQ ID NO: 8) におけるCC49一本鎖抗体LHL1のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図8はプラスミド pSL3017及びpSL3018Tの構造を示す。

図9はプラスミド p49LHL1の構造を示す。

図10はプラスミド p49LHL1の構造を示す。

図11はCC49IgG、CC49scFv2及びCC49s2Fvを用いた、競合図下としてジオキニル化 CC49Ig2を用いる競合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明細書に引入れる。

糖基、アミノ酸、ペプチド、保護基、脂性基等を略すとき、それらはIUPAC IUB (Commission on Biochemical Nomenclature) 又は関連分野の実務に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv)又は「抗体フラグメント」なる語は、V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>により表わされる、ペプチドリンカー(L)によりV<sub>H</sub>ドメインに連結されたV<sub>L</sub>ドメインを含むポリペプチドを意味する。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインとの順序は逆であつてよく、V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>として表わされるポリペプチドが獲得であろう。「ドメイン」は、独立の機能、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した2以上の一本鎖抗体

体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub> ; V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub> ; V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub> ; 又は

V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>

のV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチド間リンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された1又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインの数は等しい。

本発明は、

V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub> 又は V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>

で表される多価の一本鎖抗体を提供する。

V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub> (LHL3) 及び V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub> (LHL4) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図1に示す。非共有結合型二一本鎖抗体(Fv2)も図1に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の軽鎖及び/又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その軽鎖と重鎖可変ドメインは同一の抗原に特異的である。通知されて多価の一本鎖抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的であらうか、又は別々の抗原に対して特異的であらう。

一本鎖の多価抗体についてのDNA配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の起原が必要とされる。適当なDNA配列は公共の起原から入手するか、又は当業界に公知の標準の手順によって獲得できよう。例えば、The U.S. Department of Health and Human Servicesにより公開された Kabat の Sequences of Proteins of Immunological Interest 第4版 (1991) は、今まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を提示している。

遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローニングDNAの断片として、逆転写酵素伸介合成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの起原は広範囲にわたるハイブリドマから獲得できよう。例えば、カクログATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Cu

ture Collection, 20320 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1099) を参照のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用される。これらの細胞系及びその他の類似の細胞が、可溶ドメインをコードするmRNAの組として、又はモノクローナル抗体自体の遺伝子配列を決定するために抗体タンパク質を量産するように利用できよう。

抗体の可変領域は、適当な寄与細胞、通常は家畜動物とそれと細胞融合にはマウスを免疫することにより得られもする。その免疫原は特定の抗原であるか、又はハプタンであるか、キーホールリンペットヘンシアニン(KLH)の如きの抗原に対するこのハプタンの抗原性複合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2〜3週間置きの免疫の1又は数回の繰り返し注射によって好適に実施される。通常、最後の免疫の3日後、脾臓を取り出し、そしてmRNAが当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できるようにハイブリドーマを誘導するための細胞融合に利用する単細胞態へと解離する。

特定の抗体が獲得でき、そしてその遺伝子配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインは好ましくは、1999年3月3日に公開されたPCT出願WO 96/04410及び1989年1月26日に公開されたPCT出願WO 83/00932に開示されている、免疫細胞融合タンパク質T2抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、PCT公開第95/04410及びWO 89/00502においてCC49と表示されているモノクローナル抗体に由来するV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインである。CC49のV<sub>H</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1)は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>L</sub>の遺伝子配列(SEQ ID NO: 2)は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>H</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)は図4に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>L</sub>をコードする遺伝子配列(SEQ ID NO: 4)は図5に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多量の本発明抗体を形成するため、適当なペプチドリンカーを編ることが必要である。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインを連結するための適

当なリンカーは、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインが、一本鎖ポリペプチドであって完全抗体のものとの構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを連結するための適当なリンカーは、各イムノグロブリンフラグメントのV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインが三次元構造を有して、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次元構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なものである。希望の特性を有するリンカーは、その開示内容を引用することによって本明細書に記入する米特許第4,546,778号に開示の方法により獲得できよう。この第4,546,778号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が獲得できよう。

好ましくは、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリンカーと、2以上のscFvを連結して多量の本発明抗体を形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じ遺伝子配列を有する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その個々の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように追加されていることも必要である。

好適なリンカーは、PozzilliらのBiochem. 30, 6117-10325(1991)に開示されている2C5Cと称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にあるIsoI部位と、他端にあるHindIII部位により限定されるコードを理由に置かれていられる。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5)は下記の通りである:

Leu Ser Ala-Asp-Asp-Ala-Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys-Asp-Asp-Ala-Lys Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Lys

このリンカーは一般に10〜50のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは10〜30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンカーは12〜30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは15〜25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための免疫細胞にはプラスミド又はその他のベクターが

含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性な宿主に由来するレプリコンとコントロール配列を含む。このベクターは通常レプリコン部位、及び形質転換細胞の中での表現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保持している。例えば、大腸菌(*E. coli*)はpBR322を用いて容易に形質転換される(Bcliverら、Gene, 2, 95-(1977)又はSambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 第2版(1989))。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できよう。S. cerevisiae (S. cerevisiae)又は一連のパン酵母が真核微生物の中で最も一般的に利用されているが、数多くのその他の例、例えばPichia pastoris (Pichia pastoris)が有用である。多細胞動物、例えばATCCより入手できるSP2/0又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できよう。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミドはpSV2neo及びpSV2gpt(ATCC); pSV1及びpRSV-Z0 (Pharmacia); pDPV-1/pMD24 (International Biotechnology, Inc.)である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を免疫するための類似及び異種ウイルス発現ベクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多量抗体をコードするインサートは、その挿入部位において適合性認識部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域によって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアゼにより結核し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、前掲に記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本鎖の多量抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構築物は、構成的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ポリペプチドの合成/細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その免疫細胞は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために輸送、折りたたみ及び構成過程とつり合う。レプリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの最適な合成にとって必要な要素が必要とされる。これらの要素にはスプライシング、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の調節子及びその

生成物が生成及び折りたたみを助長するために必要とされる(シャペロン)。

用服されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たすように簡単に改変される。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクロニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選別である特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、組織DNA技術を用いて構築されたベクターにより組織的に形質転換される細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、突然変異細胞が培養細胞の中で繁殖することを防ぐうえで利用される。この態様において、かかる特異的な形質転換細胞の培養物は存在のために誘導された選択剤を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び解離は当業界に公知の標準技術を利用して達成される。例えば、もしそれが培養培養の中に分泌されるなら、この一本鎖の多量抗体は超外濾過により濃縮される。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、培養はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで限外濾過、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を実行することにより達成される。不溶性であり、且つ凝集体(refractile bodies)、凝集体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、封入体を溶解するための濃縮と洗浄の繰り返し、例えばグアニジンHClによる可溶化、及び再度の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって精製される。

一本鎖の多量抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば融合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)及びラジオイムノアッセイ(RIA)により決定される。

本発明の多量の本発明抗体は診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多量の本発明抗体の利用は、大まめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその細胞組織により迅速に到達し、そ

して身体からより迅速に排除される。

診断及び／又は治療用のため、この多価の一本鎖抗体は1又は複数の抗体フラグメントが免疫組織に対して特異的であるように、及び／又は複数の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように構築される。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び／又は治療において有用な時に好都合な薬理組成物も考慮しており、ここでこの塩的抗原はしばしば細胞の表面上で発現される。診断及び／又は治療用のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療時に当業界に公知の方法によって融合される。本発明の薬理組成物は当業界に公知の方法、例えば電解の混合、溶解又は連続乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を意図する下記の実施例の考慮により更に明らかにする。

#### 略 語

BCP	5-ブロモ-4-イコロ-3-インドールホスフェート
bp	塩基対
Bis-Trisプロパン	(1, 3-ビス(トリス(ヒドロキシメチル)-イメチルアミノ)プロパン)
BSA	牛血清アルブミン
CDR	相補性決定領域
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
Fv2	非共有一本鎖Fvダイマー
HF	等価点電気泳動
Isp	クロマト対
LB	Luria-Bertani 培地
Mab	モノクローナル抗体
MS	2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸
MR	分子軌
SDT	ニトロブルーテトラゾリウムクロリド
オリゴ	オリゴヌクレオチド

#### プラスミド

pSCFV-UV : 22のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49の可変領域とCC49H抗原とより成るscFvについてのコード配列を含むプラスミド。

p90HFL 又は p90LHL : CC49s:Fv2 LHL又はLHL生成物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

#### 実施例

##### 一般実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することで本明細書に組み入れる。Sambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York第2版(1989)及び Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York(1992)に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

##### オリゴヌクレオチドの合成及び純度

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、塩基の5'-シアノアチルホスホニミジリブ及び合成カラムを用い、Applied Biosystems(Foster City, CA)由来のModel 380A又はModel 391 BSA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、蒸水酸化アンモニウムの中で55℃で6-15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその乾燥物を30-40μlの蒸留水の中に再懸濁させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲルでの電気泳動の後、オリゴを塩基泳外(BV)光を用いて可視化させた。ENAバンドをゲルから切り出し、そして1m、100mMのトリス-HCl、pH 7.4、500mMのNaCl、5mMのDTAの中で55℃で2時間かけて溶解させた。最終精製は、DNAをSep-Pac(商標)C-18カラム(Walpole, Bedford, MA)に適用し、そして結合したオリゴを80%のメタノールで洗脱することによって行った。その洗脱の体積を約50mlに下げ、そしてDNA濃度を200nm(OD<sub>260</sub>)での光密度を測定することにより決定した。

##### 制限酵素消化

制限酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories(Gaithersburg, MD)、

PAGE	ポリアクリルアミドゲル
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	リン酸緩衝食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
pSCFV	SCFVをコードする DNA配列を含むプラスミド
RTG	ラジオイムノガイド外科
RT	ラジオリソト治療
scFv	一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントモノマー
scFvs	共有結合した一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントダイマー
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
TDS	トリス塩酸塩増水
トリス	トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン
TDS	ツイーン20洗淨液
V <sub>H</sub>	イムノグロブリン重鎖可変ドメイン
V <sub>L</sub>	イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン

#### 抗 体

CC49 : ヒト腫瘍関連タンパク質72(TA0-72)に特異的なネズミモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459として寄託。

CC49Fab : 重鎖のN-末端領域に連結している完全軽鎖より成るCC49の抗原結合性領域。

CC49s:Fv : ペプチドリンカーにより連結されているCC49抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49v2 : ダイマーを構成するように非共有結合している2つのCC49scFv。Fvの後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば、CC49v2は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2 : 3つのリンカーにより連結されている、2本のCC49V<sub>L</sub>ドメインと2本のV<sub>H</sub>ドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V<sub>L</sub>(L)とV<sub>H</sub>(H)ドメインとを連結し合わせるのに6つの可能な順序の組合せがある: LHLR, LRLH, LRLH, HLRL, HLRL及びHLLR。

New England Biolabs, Inc.(Feverly, MA)又はBoehringer Mannheim(BM, Indianapolis, IN)の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。精製させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをニチジウムブロミドで染色し、そのDNAバンドを塩基泳光により可視化させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA、pH 8.0を含む過リン酸チューブ(Etao Carbide Corp., Chicago)の中に入れた。そしてMax Submarine電気泳動装置(Boehr Scientific Instruments, CA)を用いて溶解させた。サンプル容量をSpeed Vac濃縮器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。DNAをエタノール沈殿させ、そして蒸留水の中で再溶解させた。

##### 抗原結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら、Can. Res., 46, 850-857(1986)に実質的に記載の通りに調整したTA0-72抗原を、ポリビニルクロリド96穴マイクロタイツ・プレート(Cytos Tech Laboratories, Inc., Chantilly, VA)のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのプレートをPBS中の1%のBSA及び31℃で1時間ブロックし、次いで200μlのPBS、0.05%のツイーン50で3回洗った。25μlの抗抗体及び25μlのビオチニル化CC49(1/20,000希釈率の1μg/mlの溶液)をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。プレートに結合したTA0-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び染色時間、染料は抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscFvによる結合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5μg/mlのCC49及び10μg/mlのCC49Fabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び／又はB20とした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの塩酸された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50μl(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)を加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50μlのパラニトロフェニルホスフェート溶液(PNPP; Keganard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を加え、そして染色反応を最低20分待たせた。scFv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー(Mu

Secular Devices Corporation, Menlo Park, CA)を用い404-450 nmでの光学密度スキャンニングにより測定した。scFv2の場合は、発色の同時低下に伴うデオチニル化CC49の割合の低下をもたらした。

#### SBS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SBS-PAGE分析のためのサンプル(20 $\mu$ l)を、非還元型サンプル調製バッファ Sepasol 1(Integrated Separation Systems[ISS], Natick, MA)の中で5分程度煮沸することにより調製し、そして、0-20%勾配のポリアクリルアミド Gelic bi Minigelにその製造者の仕様書(ISS)に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置(ISS)を用い、ゲル当たり55mAで、一定の電流で約75分を行った。ゲルをクマジーブリリアントブルーR 250(Bio-Rad, Richmond, CA)の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子重量標準は予め定められており(Mid Range kit, Diversified Bio-tech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた:ホスホリラーゼ、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オвалブミン、ラクトートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、ヨーグルトグロブリン及びチトクロームC。対応の分子量はそれぞれ85,000、55,000、43,000、38,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デブリーケートのゲルも移動した。電気泳動後、ゲルの一方を過塩素酸バッファ#1(0.3Mのトリス-HCl, pH10.4)の中で15-20分平衡にした。Immobilion P FVDF(ポリビニルデンジクロリン)膜(Millipore, Bedford, MA)をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に過塩素酸バッファ#1の中で3分平衡にした。Milliblot-SDE装置(Millipore)を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一層の過塩素酸バッファ#1を陽極電極の中央に載せた。Whatman 3MM 濾紙のシートを過塩素酸バッファ#1の中に浸し、そしてその電極面の上に滑らかに置いた。過塩素酸バッファ#2(25mMのトリス, pH10.4)の中に浸した引の電極を一夜日の上に載せた。次に濡れたFVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に置き、そして最後に過塩素酸バッファ#4(40mMのグリシン中の25mMのトリスHCl, pH9.4)の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mAの定電流(初期電圧は8-20ボルトに範囲した)を用いて30分で遂げられた。

通常のプロトコールに従ったが、ただし過塩素酸バッファ#1として、0.1Mのクエン酸ナトリウム, pH 3.0を用いた。過塩素酸 1.0Mのトリス-HCl, pH 9.0を用いてpH7に中和した。デオチニル化反応は下記の通りに設定した。FA10 14(1 $\mu$ g、水の中で100 $\mu$ l)を100 $\mu$ lの0.1MのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.6と混合した。デオチニル化(アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA)(2.5mM)を0.5mMのジメチルスルホキシドの口に溶かした。Biotin-X-NHS溶液(20 $\mu$ l)をFA10 14溶液に加え、そして22℃で4時間反応させた。過剰のデオチニル及び不純物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム(Piscataway, NJ)を用いてゲル濾過により除去した。0.8 $\mu$ l/minの流速で、デオチニル化 FA10 14は16.8minのピークで出現した。このピークを構成する兩分をプールし、そして4℃で保存し、そしてCC49V、及びVn CNRにより決定されるCC49イディオタイプを検出するために用いた。

#### 等電点電気泳動(IEF)

等電点(pI)は、BIBAS'AR(Madison, WI)を介して入手できる PRUT3IN-TITRATEという名のコンピュータプログラムを用いて決定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに於いて誤差が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計数はCに調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的にpIを、Isogenアガラス IEFプレート、pH範囲3-10(Pharmacia products, Rockland, ME)を用いて決定した。Biorad bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEFを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト(限界)、20mAの電流及び10Wの定電電力とした。等電点泳動は90minで完了した。IEF標準品はBioradより購入した。そのセットはフィコシアニン、ヨーグルトグロブリンB、牛炭酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬チトクロニンヒトヘモグロビンA及びC、3レチンレクテン及びチトクロームCを含む。それらのpI値は4.65、5.10、6.00、6.80、7.00、7.10及び7.50、7.80、8.00並びに8.20及び9.50である。ゲルを、PVCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

CC49抗体種の定量

ブロットした後、その膜を水の中で洗浄にすぎず、そして20mlのブロッキング溶液(トリス緩衝食塩水(TBS)中の1%の牛血清アルブミン(BSA)(Sigma, St. Louis, MO)を含むものの中に入れた。TBSはPierce Chemical(Rockford, IL)より、牛胎肝粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を提供する。これらの膜を最少限1時間は、室温でブロックし、そして20mlづつ0.5%のソイーン20洗浄液(TTBS)を用いて5分間3回洗った。TTBSを製するするには、0.5mlのソイーン20(Sigma)をTBSのリッター当たり混合した。使用したブローブ抗体は20mlのデオチニル化 FA10 14溶液とした(10 $\mu$ g/20mlの抗体バッファ)。抗体バッファは100mlのTTBS当たり1gのBSAを加えることにより作った。閉閉状態で30-60分ブローブした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を室温において30-60分、洗浄バッファの中で1:500希釈率のアルカリホスファターゼの複合されたストレプトアビジン(Southern Bio technology Associates, Birmingstn, AL)20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。先述反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファ(20ml)の中で2分洗った。このバッファは、0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMのMgCl<sub>2</sub>・H<sub>2</sub>O, pH 8とした。アルカリホスファターゼにとっての基質を作るため、ニトロブルー-テトラゾリウム(NBT)クロリド(50mg, Sigma)を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-1-クロロ-3-インドール-3-インドールホルスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブromo-1-クロロ-3-インドールホルスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液も、Promegaよりウェスタン染色剤として市販されている。染色のため、それぞれ120 $\mu$ lを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで染色液からそれらを水で洗い流した。

#### デオチニル化 FA10 14

FA10 14は、CC49に対して特異的な、ATCC No. CRL10256として寄託されているネズミの抗-イデオタイプ抗体IgG2a、K(Aブゾグリア)である。FA10 14をNygene Protein Aアフィニティカラム(Yonkers, NY)を用いて精製した。製

IgG、scFv2の種および分子量はFvを含む精製CC49抗体はすべて、混合している1.0 $\mu$ m光路長の石英製キュベット(Mellin社)およびPerkin-Elmer UV/VIS分光光度計SEC22を用いて、タンパク質希釈液の280nm波長の吸収度を測定して定量した。モル吸光係数(E<sub>m</sub>)は、各抗体について、下記式を用いて測定した。

$$E_m = (\text{Trp数}) \times 5,500 + (\text{Tyr数}) \times 1,340 - ((\text{Cys}) 2 \text{ 残}) \times 150 - (\text{Phe数}) \times 10$$

これらの値は、B.B.Watlsfer, Advances in Protein Chemistry, 17巻、375-378頁に記載されている情報に基づいている。

#### 高性能液体クロマトグラフィー

CC49scFv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、金体にチタンまたはチタノン鍍金を用いた HPLC システムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型検出器、270nmの吸光度に設定された UV CORE 5II 2238 型検出装置および2011型 SuperRac fraction collectorで構成されている。

#### サブユニットの pI による型選

ポリマーゼ連鎖反応(PCR)はすべて、IEEプログラム(pg)のプラスミド種別(pSCFV2)；103ピコモルのプライマー；1 $\mu$ lのPerkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州、ノーウーク所在の PCC社)の Ampli-Taqポリマーゼ；10 $\mu$ lの10mM dNTPおよび10 $\mu$ lの10 $\times$ 緩衝液(両者ともに PCC社に提供されている)；ならびに合計容積を100 $\mu$ lにするのに充分な水で構成された反応混合液で行った。PCR反応はメーカーが定まっているのとはほとんど同様にして行った。これらの反応は、PCC R600型サーモサイクル(thermocycler)を用いて36サイクルを行ったが、その1サイクルは、94℃で20-45秒間の DNAの解性；52-60℃で0.5-1.5分間のアニーリングおよび72℃で0.5-2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在)の330A型もしくは361型 DNA合成器で合成し次いで上記のようにして精製した。

#### リゲーション

100mMのベクター DNAおよび対応する1:1化学量論的当量のインダント DNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社（米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在）のT4 DNAリガーキットを用い、該メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物（全容積20 $\mu$ L）は最初18℃でインキュベートし、次いで一夜4℃まで徐々に冷却した。

#### 形質転換

形質転換は、100 $\mu$ LのStratagene社の大腸菌（E.coli）AG1コンピエント細胞（米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStratagene社）を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物由来のDNA（1～5 $\mu$ L）を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、混合を続けながらルリアブロス（LB）中で37℃で1時間再生させ、続いて、pSCFVTHM、p49LHBLもしくはp49LHBLに用いる20 $\mu$ g/mLのクロラムフェニコール含有（CAM20）ルリア寒天上にプレートし、またはブラスミドpSL301を含有するクローンもしくはpSL301由来のその後の構築物に用いる100 $\mu$ g/mLアンピシリン（AMP100）ルリア寒天プレート（LB+AMP100）上にプレートした。

#### 大腸菌クローンのスクリーニング

細胞ブラスミドは、Promega社（米国、ウィスコンシン州、マディソン所在）のMagicミニプレップブラスミド製造キットを用いて、梅火王（selection pressure）を維持するため適切な濃度を含有するLBブロス培養物から分離した。このキットはメーカーの取扱説明書にしたがって使用した。

#### ブラスミドの検出

p49LHBLおよびp49LHBLと命名された2種のブラスミドを、多量の一本鎖抗体を製造するために構築した。p49LHBLを含有する宿主細胞は、V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>で表すことができるペリペプチドを産生した。ここでV<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー（L）は、下記 SEQ ID NO: 5の配列を有する25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys-Asp-Ala-Ala-Lys Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Lys-Asp-Lys-Asp-Leu

p49LHBLを含有する宿主細胞は、V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>で表すことができる

ペリペプチドを産生した。ここでV<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびLは上記アミノ酸配列を有するペプチドリリンカーである。

CC49V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>（p49LHBL）のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 6）とアミノ酸配列（SEQ ID NO: 7）を図6に示す。CC49V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>（p49LHBL）のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 8）およびアミノ酸配列（SEQ ID NO: 9）を図7に示す。

#### pSL301HTの構築

pSL301HTの構築を図8に示す。バシラス・リベニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）のペニシリン耐性P（penP）ターミナーターの配列を、Xho I および BamHI で45分間消化することによって、pSCFV THMに命名されたブラスミドから取出し、電気泳動を行った後、4.5%ポリアクリルアミドゲルから切り取り、電気泳動させ、エタノールで沈殿させ、次に、同様に製造されたベクター：pSL301（米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社）中の同じ部位に連結した。pSCFV THMの製造手順は、1992年8月21日付け出版の米国特許第5,970,935号に記載されている。なおこの出願の開示事項は本願に採用するものである。一段に、pSCFV THMは、penPプロモーターのヌクレオチド配列；適当 Nco I 制限部位；CC49V<sub>L</sub> 領域；HindIII制限部位；25個のアミノ酸のリンカー；固有 Xho I 制限部位；CC49V<sub>H</sub> 領域；Nhe I 制限部位；penPターミナーター；および BamHI 制限部位を含有している（図8参照）。このpenPプロモーターとpenPターミナーターは、Beckman, J.Biol.Chem., 256巻、1211～1218頁、1981年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部（3 $\mu$ L）を、LB+AMP100寒天プレート上にプレートし、次いで一夜増殖させたコンピエント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。penPターミナーター、インサートを含有するポテンシャルクローンを、Pharmacia社（米国、マリランド州、ガイサースバーグ所在）の T7 Quickprime<sup>TM</sup> DNA合成キットと、Bulowelyら、Nucleic Acid Research, 17巻、452頁、1989年に記載されているマイクロ波によるコロニー溶解法とともに用いてスクリーニングした。プロトタイプ、penP-Xho I-BamHIターミナーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによって提供された指示によって製造し、使

用した。陽性プローブであり、かつ BamI および NaeI による消化物由来の 207 塩の遮蔽対照入断片（図9に示す 958～2,059の塩基対（bp）を含有するクローンをpSL301HTと命名し、次いでCC49VHに対するヌクレオチド配列を含有するpSL301HTを構築するのに選択した。Xho I-BamI-penPターミナーターをpSL301中に配置した理由は、その Xho I と BamI の部位の間のポリリンカー領域中に存在する Bca47II制限ニンドヌクレアーゼ部位を除くためであった。このことは、Bca47II部位が、細胞中に各ヌクレチドを配置するのにユニークである必要があるV<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>の領域を挟いて構築するため設計された。各V領域がEcc47II-XhoI部位に付加されると、Ecc47IIは各場合に破壊されて、ユニーク挿入断片に入ってくる次のBca47II部位を形成した。

V<sub>L</sub>配列は、PCR増幅の標的としてpSCFV THMを用い、オリゴの5' SCFVと3'オリゴSCP5によってFCRで作製した。SCP1に対するDNA配列（SEQ ID NO: 10）とSCP5に対するRNA配列（SEQ ID NO: 11）は次のとおりである。

SCP1: 5' -TAAA CTC CAG GTT CAG TTC CAG CAG-3'

SCP5: 5' -TAAA GCT AGC ACCA AGC GGT TAG TGA GCA GCA GCT CAC TGA GGT-3'

下線をつけた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増幅されたV<sub>L</sub> DNAを、1MのPAG、電気泳動、エタノールによる沈殿および20 $\mu$ L水への溶解によって増幅した。そのV<sub>L</sub>配列をXhoIとNheIの制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化され残って構築されたpSL301HTベクターに対するインサートとして用いた。標準のリゲーション反応を行い、次いで一部分（4 $\mu$ L）を用いてコンピエント大腸菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB+AMP100寒天プレート上にプレートした。CC49V<sub>L</sub>インサートを含有していることを示す顕微鏡的クローンをNheIおよびXhoI消化スクリーンから取出した。

United States Biochemical（USB）社（米国、オハイオ州クリーブランド所在）のSequence Kit、および配列決定プライマー-pSL301SEQ6（pSL301ベクター中、XhoI部位から57bp上流においてアニールした21bpの配列決定プライマー）とCC49VHPを用いて、BKAの原形決定を行って、（CC49V<sub>L</sub>）の配列を確認し、pSL301HT中に正しいCC49V<sub>L</sub>配列を有するクローンを明らかにした。このブラスミドは

pSL301-THTおよびpSL301-HTの両方を構築するときの出発点で使用した。使用した配列決定用のオリゴをここに示す。

pSL301SEQ8（SEQ ID NO: 12）およびCC49V<sub>L</sub>（SEQ ID NO: 13）のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQ8: 5' YCG TCG GAT TAG GCA AGC TTA 3'

CC49VHP: 3' -GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG 3'

#### 実施例1-p49LHBLの構築

pSL301HT（5 $\mu$ g）を出発物質として用い、これをBca47IIおよびNheIで消化し、大きい方のベクターフラグメントを精製した。CC49V<sub>H</sub>挿入フラグメントは、5'オリゴとしてSCFVを用い、かつ3'オリゴとしてSCP5を用い、PCRによって製造した。SCFVのヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 14）は下記のとおりである。

SCFV: 5' -TAAA TCG GCA GAT GAG GCA AAG AAA GCA GCA GCT AAA AAA GAG GAT GGC AAA AAG CAT GAC GGC AAG AAA GAT TTT GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT-3'

またオリゴSCFVはリンカーのコーディング領域の一部（SEQ ID NO: 14のbp 8～78）を含有している。pSCFV THM中のCC49VH標的でアニールするよう設計された該オリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp 77～90由来のものである。

下線をつけた配列はPspI部位に相当する。得られたPCRインサートを増幅し、PspIとNheIで消化し、次いでpSL301HT-Ecc47II-XhoIベクターとのリゲーション反応に用いた（図7）。コンピエント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物（3 $\mu$ L）で形質転換を行うのに用い、LB+AMP100寒天プレート上にプレートした。pSL301HT生成物を示す正しい大きさのXhoI-NheIインサートを含有する2個のクローンの配列をオリゴ30Q1を用いて決定し、正しい配列（SEQ ID NO: 15）を有する単クローンをその後の構築に用いるのに選んだ。SCP1のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 15）は下記のとおりである。

SCP1: 5' -TC ACT TTA GCT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカーV<sub>L</sub>サブユニット（bp1544～1663、図7）は、5'オリゴのSCP7と3'オリゴのSCP8を用い、かつPCRの標的としてpSCFV THMを用いて製造

した。SCP7cのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 16)は下記のとおりである。

SCP7b: 5' -TAA TGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT  
GCG AAA AAG GAT GAG GCG AAG AAA GAT CTT GTC ATG TCA CAG TTT  
CC

下線を付けたヌクレオチドは PspI 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記のとおりである。

SCP8a: 5' -TAAA GGT AGC TTT TTA CTT AGC CAC  
CAG CTT GGT GGC-3'

下線を付けた最初の二塩は NheI 部位に相当し、もう一つの塩は AflII 部位に相当する。SCP7dのヌクレオチド8〜70はリンカーをコードし(図7のヌクレオチド1546〜1612)、一方V<sub>1</sub>にアニールするヌクレオチド77〜93は図7の1013〜1035に相当する。プライマー SCP8aは、その5'末端の短いチール、NheI制限部位、終止コドン、AflII制限部位およびV<sub>1</sub>の最後の2個の塩基を含有している。FspIとNheIによる消化の後、この得られた420bpのインサートを精製して精製pSL30HITベクターのNheIとEco47IIIの部位に連結し、最終的なクロノンをNheIとIbaIでスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつ46LPR2(-)とSQP1で配列が決定されて、pSL30HIT中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18)は下記のとおりである。

46LPR2(-): 5' -CTG CTG GTA CCA GCG CAA G-3'

プラスミドpSL30HITをNheIおよびIbaIで消化し、精製し、得られた1376bp V<sub>1</sub>、リンカー、リンカー-V<sub>1</sub>セグメントをpSCFV UHMに連結してp49LHLEを製造した。なおこのpSCFV UHMは同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応生成物(4μL部分)を用いてコンピナント大腸菌AG1細胞(Stratagene社)を形質転換し、LB/CA/200寒天プレートにプレートした。正しい制限酵素増殖を有するプラスミドを含有する単クローンを、p49LHLEを含有させるために選択した。p49LHLEは、GC49多価一本鎖抗体 scFv2: V<sub>L</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>2</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>3</sub>。またはGC49scFv2 (LHLE)のpucPプロモーターとヌクレオチド配列を含有している。

りは次のステップで修正され、オリゴSCP9C (SEQ ID NO: 21)の末端に5塩基の欠失を相違なることによってpSL30HITを製造した。

SCP9C: 5' -TAAAGCGGTGATGATGCTAAGAAGAGCGCCGCAAAAA  
CGACGACCCCAAAAAGATGATGCAAAAAGAGATCTCG  
AGGCTTCACTTGCAGCACTCTGAC-3'

SCP9C中の下線を付けた配列はEco47III部位に相当する。PCRにおいて、SCP6Cは5'オリゴとして用いられ一方SCP16は3'オリゴとして用いられ、リンカーGC49V<sub>1</sub>セグメントが生成する。SCP16のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 22)はV<sub>2</sub>のとおりである。

SCP16: 5' -TTC TGC CTT TTT ATG AGG AGA GCG TCA  
CTG AGG TT 3'

SCP10中の下線を付けた配列は図6のヌクレオチド1958〜1963に見られるNheI部位に相当する。この場合、PCRインサートはNheIだけで消化されたいで精製される。ベクター(pSL30HIT)はEco47III部位(先に形成されている)およびNheI部位で消化されたいで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3μL)を使ってコンピナントイー・コリAQ1細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB-AMP100プレート上にプレートし次いで候補的クローンをIbaIとNheIでスクリーニングした。正しい大きさのDNAを有する5個のクローンを得た。これらのクローンのうちの2個は、オリゴ49VLPR3(-)およびSQP1を用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列(49VLPR3(-)の499〜504)は下記のとおりである。

49VLPR3(-): 5' CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図6のヌクレオチド1958〜1963からの配列が確認され、正しいpSL30HITクローンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミドp49LHLEを製造するために、pSL30HIT(5μg)をNheIとIbaIで消化し、次いでV<sub>L</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>2</sub>-V<sub>L</sub>配列を含有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCFV UHM(5μg)をIbaIとNheIで消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記連結混合物の一部(4μL)を使ってコンピナント大腸菌AG1

変換例2: p49LHLEの構造

p49LHLEの構造を図10に図式的に示す。リンカーV<sub>1</sub>のサブユニットをオリゴのSCP7bと3'オリゴのSCP9で製造した。

SCP9: 5' -TAA AGC TAG CAC CAA GCG CTT AGT TTC  
AGC ACC AGC TTG GTC CCA G 3'

SCP7bオリゴ(ヌクレオチド8〜70)は図6のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124〜1192に相当する)および図6のV<sub>1</sub>のヌクレオチド1169〜1215に相当する。PCRに対するpSCFV UHM断片(ヌクレオチド77〜93)にアニールした。

SCP9は、NheI部位(第一の下線を付けたヌクレオチド)とEco47III部位(第二の下線を付けたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次のV領域を受けるためのpSL30HITを作るのに必要な制限部位である。SCP9のヌクレオチド18〜28は図6のヌクレオチド1002〜1007(リンカーの最初の2個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド29〜46は、PCRにおけるSCP9(SEQ ID NO: 19)のアニール領域である図5に示すヌクレオチド1508〜1531に相当する。プラスミドpSL30HITをEco47IIIとNheIで消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予めFspIとNheIで処理され精製された、PCRからのリンカーGC49V<sub>1</sub>DNAインサートと連結させる。その連結混合物(3μL)を用いて大腸菌AG1コンピナント細胞を形質転換し、正しいNheI〜IbaIの大きい方のフラグメントを有する一つのクローンの配列をオリゴFSP/SEQ2を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 23)は下記のとおりである。

5' TTG ATC ACC AAG TCA CTT TAT G 3'

配列決定の結果は、得られたpSL30HITクローン中にPCRの誤りと欠失があるということを示した。図6にみられるヌクレオチド1533〜1537に相当する5塩基の塩基の欠失がみとめられ、そしてTであるべきはずのヌクレオチド1531はDNA配列のデバックから確認したところ実際にはGであった。得られた配列は、

5' ...CAAGCGCTT ...であった。

こで下線を付けた配列は偶然にEco47III部位を形成した。図6のAGGCGTの配列はヌクレオチド1530、1531、1532、1538、1539および1540に相当する。この例ま

細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物をLB-CAN20プレート上にプレートし、次いでp49LHLEに対する代数的なクローンを、正しい制限酵素増殖(図10参照)およびTAG72に対する生物活性に基づいて選択した。

変換例3 GC49 scFv2のLHLEとLHLEが共有結合した二量体の精製

GC49の共有結合した一本鎖二量体(scFv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラズマ膜成分を、p49LHLEとp49LHLEの両方の1.3Lの第一培養物から調製した。集約すると、培養物を250mLずつの4部分に分割し、Sorvall GS-3ロータで10分間5300rpmで遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaClを含有する10mMトリス-HCl pH 7.3からなる100mL中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計100mLの30mMトリス-HCl pH 3.5で洗浄し、そして一つのチューブにプールした。このチューブで、40w/v%のスクロースを含有する30mMトリス-HCl pH 7.3(100mL)および10mM EDTA pH 7.5(2.5mL)を添加した。得られた混合物を、時々振盪しながら、空室に10分間保持した。再活性細胞(Extinction cell)を同様のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mLの水(0.5mM NaCl)中に速やかに懸濁させ、次いで時々振盪しながら氷上に10分間保持した。その細胞を同様のようにしてペレット化し、大腸菌の両細胞質成分を含有する上澄み液を、0.2μmのNalgene社(米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在)の透過装置で濾過することによってさらに清澄にし、次いでAmicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)のCentrifuge 30およびCentrifuge 30で1.6mLより小さい容積まで濃縮した。

p49LHLEまたはp49LHLEのクローン由来の透過膜細胞質のジャケット(shock cell)を、Pharmacia社(米国、ニュージャージー州、ピスカタニイ所在)のSuperdex T5 HR 10/30 BPLCカラム(予めP38で平衡化させたもの)に注入した。結合ELISA法で測定する場合、問題の生成物は0.5μL/分の流量で2〜24分洗脱させた。活性成分をプールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、システム500 Microdialyser Unit(Pierce Chemical社)を用い、緩衝液を3〜4回置換しながら8000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリス-HCl pH 7.6に対して一夜透析を行った。その試料をPharmacia社のHoechst Hx 5/5アニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mMトリス-HCl pH 7.6を用い、緩衝液Bとし



て20Mトリス-HCl pH 7.6に0.5M NaCl を含める勾配プログラムを、1.5ml/minの流量で使用した。同様の生成物は、結合 ELISA法で測定する場合、各々3〜4分間カラムから放出させた。この時点の両方の、二つの SDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクローマシーリアントブルー3250で染色し、他方のゲルはウエスタン分析（ブローブ抗体としてビオチニル化 PAID-14を使用）に移されたが、scFv2(LHLHまたはLHHL)の種の計算分子量の単一バンドが、55,239ダルトンの位置に出現した。活性成分は各場合濃縮し、50mM MES pH 5.8に対して一夜透析し、次いで Pharmacia社のMono S HR 5/5カチオン交換カラムに注射した。この精製ステップからの両種の二つの百分の5と6は、SDS-PAGE法およびELISA法で測定する場合、勾配法の検出が開始される直前に放出された。したがってこれらの百分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで百分5と6はさらに精製するためにブールした。

Mono Qカラムを活性Xeno S缸分について再度使用したが使用した緩衝液は20mMトリス-HCl pH 8.0であり、流量は0.8ml/minに低下させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分電は5〜6分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

#### 等電点電気泳動

精製物の等電点(pI)は DEXSTAR社（米国、ワシントン州、マディソン所在）のコンピュータプログラム Protein-tiltateを使用して予測した。アミノ酸組成、およびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、PNC Bioproducts社（米国、メーン州、ロックランド所在）のImmunel IEPプリントpH範囲3〜10を使用して測定した。上記 IEPを操作するために、Biorad社（米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在）の電気泳動装置を、上記メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mAで500V（限定）および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は30分間で完了した。Biorad社の IEP標準品は、フィコシアニン、βラクトグロブリンB、ウシカルボニクタンヒドローゼ、ヒトカルボニクタンヒドローゼ、ウミイオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のドラマメンタンおよびシトクロム

Cが含有され、pI値はそれぞれ4.55、5.13、6.00、6.59、7.09、7.50、7.8、8.0、8.20 および 9.6であった。ゲルは FMCの指示にしたがって染色し脱色した。DEXSTAR プログラムによって両方の scFv2の種のpI値として 9.1の値が予測された。純品の生成物に対し単一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の 0.5の位置にみとめられた。

IgG, scFv2 (LHLHおよびLHHL)のような精製5049抗体は、280nm波長の吸光度を分光学的に測定することによって定量した。モル吸光係数値は、各々、先に引用した Wellawferの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG, CC49scFv2(LHLH), CC49-scFv2(LHHL)およびCC49scFvのモル% (280nm)値はそれぞれ 1.49、1.65、1.65 および1.71であった。

#### 実験例4

CC49scFv2の種のLHLHとLHHLの相対活性を、IgGおよびCUD11抗体にFLAGペプチドを有する平量体scFv型と比較した。

パーセント競合(percent competition)を下記式によって ELISAのデータから求めた。

$$\text{ゼロ競合} = \frac{\text{試料誘取り値 (OD 405-450nm)}}{\text{ゼロ競合} = 100\% \text{競合}} \times 100$$

"ゼロ競合(zero competition)"値は、1% BSAをビオチニル化CC49 (3×10〜14モル)と1:1比率で混合して測定し、一方 100%競合率はビオチニル化 CC49IgGと混合した CC49IgGの5 μg/ml試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は405nm〜450nmで測定した。3回の誘取り値の平均値を使用した。最初に試料(25 μL)を、TAG-72でコートしたマイクロリットルプレートに、1.0×10<sup>10</sup> ールの結合単位/mlで塗布した。ビオチニル化CC49 (4 μg/ml 1:20,000に希釈、25 μL使用)で試料を1/2濃度に希釈した。逆反滴定法(1:2)を行った。両方の形態の scFv2は IgGにはV等しい(図11参照)。別の試験で、CC49scFv平量体を Pabフラグメントと比較した。両者は一値であるが、これらは TAG-72に対する結合アフィニティが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの充分に

機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の値に比べて全 IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、その CC49IgGの型と同等に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および一層広範囲な生体分布薬物動態の利点を有することを示している。この利点によって、既述の IgG分子に比べて、本発明の化合物は多量回注射することができ、かつ副作用に用いる免疫治療法において腫瘍：組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施態様は、本明細書を検討するかまたは本面に開示されている説明を実施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の真の範囲は図11の意図は以下の請求の範囲によって示される。

以 上

#### 請求の範囲

1. 2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第1のペプチドリンカーを介して共有結合されており、この第1のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys  
Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu

を有し、

そして各フラグメントは：

- (a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結させる第二のペプチドリンカー；

を含んで成る、多価の一本鎖抗体。

2. 前記抗体可変領域が下記の配列

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val  
Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu  
Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Asp Tyr Gln Gln Lys  
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg  
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala  
Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly  
Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

と實質的に同じアミノ酸配列を有しており、そして前記軽鎖可変領域が下記の配列

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly  
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu  
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr

Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser  
Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp  
Cly Cln Cly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

と実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

3. 前記第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

4. 多価の一本鎖抗体をコードする DNA 配列であって、この多価の一本鎖抗体が2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する特異性を有しており、ここでこれらのフラグメントは前記のペプチドリンカーを介して共有結合されておき、そして各フラグメントは:

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド;及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機械的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、DNA配列。

5. 前記第一ポリペプチドをコードする配列が下記の配列:

GAC ATT GTC ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA  
GTF GCC CAG AAG GTC ACC TTC AGC TCC AAG TCC AGT CAG AGC  
CTT TCA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC  
CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTC CTG ATT TAC TTG  
GCA TCC GGT ACC CAA TCT CGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC  
AGT GGA TCT GGG ACA CAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG  
AAG ACT GAA GAC CTG GCA GGT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT  
AGC TAT CCC CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTG  
AAG

と実質的に同じであり、そして前記第二ポリペプチドをコードする配列が下記の配列:

GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT  
GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TCC AAG GCT TCT GGC TAC ACC  
TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAG GGT GAA  
CAC CGC CTG GAA TGS ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT  
GAT TTT AAA TAC AAT CAG AGG TTC AAG GGC AAG GGC ACA CTG  
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT CCC TAC GTG CAG CTC AAC  
AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GCG TAT TTC TGT ACA AGA  
TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTG ACC  
GTC TCC TCA

と実質的に同じである、請求項1記載の DNA配列。